

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Zdobinský

Delece v lidské mitochondriální DNA a příčiny jejich vzniku
Deletions in human mitochondrial DNA and causes of their formation

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Markéta Tesařová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.8.2017

Podpis

Poděkování

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR AZV 17-30965A a institucionální podporou Univerzity Karlovy PROGRES Q26/LF1/3.

Rád bych poděkoval paní doktorce Tesařové především za její velkou trpělivost. Dále děkuji své rodině a přátelům za jejich shovívavost a podporu.

Abstrakt

Mitochondrie jsou orgány eukaryotních buněk zajišťující především energetický metabolismus, podílí se však i na metabolických dějích jako je biosyntéza aminokyselin, hemových skupin, železosírných komplexů aj. Mitochondriální poruchy představují heterogenní skupinu onemocnění, která se mohou projevit jak v dětském, tak v dospělém věku. Postihují odlišným způsobem různé tkáně a orgány, nejčastěji se však projevují poruchami nervového systému, kosterní svaloviny, případně jater, ledvin nebo endokrinní soustavy. Delece mitochondriální DNA se podílí na patologii mnoha z těchto onemocnění a jsou příznakem několika syndromů. Vznikají pravděpodobně v důsledku zastavení replikačního aparátu během replikace mitochondriální DNA a následného vzniku dvouřetězcového zlomu. To může být způsobeno především patogenními změnami proteinů replikačního aparátu a metabolismu nukleotidů. Cílem této práce je shrnutí poznatků o stavbě mitochondrií a struktuře a replikaci jejich genomu, ale především vytvoření přehledu nejdůležitějších proteinů, jejichž mutace vede ke vzniku mitochondriálních onemocnění doprovázených delecemi v mtDNA, a poznatků o mechanismu jejich vzniku.

Klíčová slova: mitochondriální DNA, delece, oxidativní fosforylace, mitochondriální onemocnění

Abstract

Mitochondria are organelles of eukaryotic cells that primarily provide energy metabolism, but also participate in metabolic processes such as biosynthesis of amino acids, heme groups, Fe-S clusters etc. Mitochondrial disorders represent heterogeneous group of diseases which can occur in both child and adult life. They affect various tissues and organs in different ways, most often manifesting themselves as disorders of nervous system, skeletal muscle, liver, kidneys or endocrine system. Mitochondrial DNA deletions contribute to pathogenesis of many of those diseases and they are a symptom of several defined syndromes. They most likely arise as a result of replication stalling resulting in a double strand break of DNA. This can be caused primarily by pathogenic changes in replication apparatus and nucleotide metabolism proteins. The aim of this work is to summarize the knowledge about mitochondria and structure and replication of their genome, but also to create a summary of the most important proteins whose mutation leads to mitochondrial diseases accompanied by deletions in mtDNA and to outline the mechanism by which they arise.

Key words: mitochondrial DNA, deletion, oxidative phosphorylation, mitochondrial disease

Seznam použitých zkratk

7S DNA	třetí řetězec DNA v nekódující oblasti mtDNA podílející se na tvorbě D-smyčky
AAV	adeno-associated virus
ADP	adenosindifosfát
adPEO	autosomálně dominantně dědičná progresivní externí oftalmoplegie
AHS	Alpersův-Huttenlocherův syndrom
ANS	ataxia neuropathy spectrum; spektrum ataxie a neuropatie
ANT1	adenine nucleotide translocator 1; přenašeč adenosinových nukleotidů 1
arPEO	autosomálně recesivně dědičná progresivní externí oftalmoplegie
ATP	adenosintrifosfát
BER	base excision repair; básová excizní oprava
<i>C10orf2</i>	gen kódující mitochondriální helikázu Twinkle, také <i>PEO1</i>
CMT2A	syndrom Charcot-Marie-Tooth typu 2A
CsCl	chlorid cesný
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DGUOK	deoxyguanosinkináza
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DNA2	protein s ATPázovou, helikázovou a nukleázovou aktivitou
DnaB	replikativní DNA helikáza <i>E. coli</i>
DNC	deoxynucleotide carrier; deoxynukleotidový přenašeč vnitřní mitochondriální membrány
Dnm1	protein zajišťující dělení mitochondrií kvasinek
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
DRP	dynamamin-related protein; protein příbuzný dynaminu
DRP1	protein zajišťující dělení mitochondrií savců
DSBs	double-strand breaks; dvouřetězcové zlomy DNA
dsDNA	double-stranded DNA, dvouřetězcová DNA
dT	deoxytymidinmonofosfát v DNA
dThd	deoxytymidin
<i>ECGF1</i>	gen kódující thymidinofosforylázu
ENT1	equilibrative nucleoside transporter; rovnovážný přenašeč nukleosidů
EPI-743	analog koenzymu Q ₁₀ používaný k terapii některých mitochondriálních onemocnění
ER	endoplasmatické retikulum
ERMD	ER-associated mitochondrial division; s ER asociované dělení

	mitochondrií
ERMES	ER-mitochondrial encounter structure; proteinový komplex kontaktu ER a mitochondrií
ETC	electron transport chain; elektron-transportní řetězec
FADH₂	flavinadenin dinukleotid
FIS1	protein podílející se na dělení mitochondrií
FMN	flavinmononukleotid
Fzo1	protein zajišťující splývání mitochondrií kvasinek
G2/M	přechod G2 (growth; růstová) a M (mitosis; mitóza) fáze buněčného cyklu
Gem1	protein kvasinek příbuzný proteinům Miro
gp1 RNA polymeráza	RNA polymeráza bakteriofága T7
gp4 primáza-helikáza	primáza/helikáza bakteriofága T7
gp5 DNA polymeráza	DNA polymeráza bakteriofága T7
GTP	guanosintrifosfát
hDNA2	lidský protein s ATPázovou, helikázovou a nukleázovou aktivitou
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk pocházejících z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové
HMG-box	high mobility group-box; vysoce mobilní skupina, pův. podle vysoké pohyblivosti v elektroforetickém poli
hPIF1	lidský protein s helikázovou aktivitou
HSP	heavy strand promoter; promotor těžkého řetězce
IOSCA	infantile onset spinocerebellar ataxia; spinocerebelární ataxie s nástupem v dětském věku
KSS	Kearnsův-Sayreův syndrom
Lon	rodina serinových proteáz
LSP	light strand promoter; promotor lehkého řetězce
MCPHA	Amish lethal microcephaly; smrtelná mikrocefalie Amišů
MEMSA	myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia; syndrom myoklonické epilepsie, myopatie a sensorické ataxie
MFF	protein podílející se na dělení mitochondrií
MFN	mitofusin; protein zajišťující splývání mitochondrií savců
Mgm1	protein zajišťující splývání mitochondrií savců
MGME1	mitochondrial genom maintenance 5'–3' exonuclease 1; exonukleáza údržby mitochondriálního genomu 1
MCHS	myocerebrohepatopathy spectrum; spektrum dětské myocerebrohepatopatie

MICOS	mitochondrial contact site and cristae organizing system; komplex proteinů podílející se na organizaci vnitřní mitochondriální membrány
Milton/TRAK	kinesinový adaptorový protein
Mip1	homolog katalytické podjednotky polymerázy γ u <i>S. cerevisiae</i>
MIP1	gen mitochondriálního SSB proteinu <i>S. cerevisiae</i>
MIRAS	mitochondrial-associated ataxia syndrome; ataxie asociovaná s mitochondriemi
MIRO1	protein připojující mitochondrie ke kinesinovému adaptorovému proteinu Milton/TRAK
MIRO2	protein připojující mitochondrie ke kinesinovému adaptorovému proteinu Milton/TRAK
MNGIE	mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization; permeabilizace vnější mitochondriální membrány během apoptózy
<i>mPif1</i>	myší gen proteinu PIF1
Mrp	rodina prokaryotních membránových iontových antiportérů
MT-ATP6	Gen kódující podjednotku ATP6 F ₀ domény ATPsyntázy
mtDNA	mitochondriální DNA
mtSSB	mitochondrial single strand binding protein; protein vázající jednořetězcovou DNA
N2	železosírný komplex ETC komplexu I
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NARP	neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa; neropatie, ataxie a retinitis pigmentosa
NCR	non-coding region; nekódující oblast
nDNA	jaderná DNA
NDUFV1	51kDa podjednotka ETC komplexu I
NLS	nuclear localization sequence, jaderná lokalizační sekvence
nt	nukleotid
NTP	ribonukleosidtrifosfát
O_H	počátek replikace těžkého řetězce
O_L	počátek replikace lehkého řetězce
OMA1	metaloproteáza
OPA1	optic atrophy 1; protein zajišťující splývání mitochondrií savců
OriZ	oblast počátku replikace mtDNA synchronního modelu
OXPHOS	systém oxidativní fosforylace

PD-(D/E)XK	superrodina fosfodiesteráz s rozmanitými funkcemi
PEO	progresivní externí oftalmoplegie
PEO1	progressive external ophthalmoplegia 1; gen mitochondriální helikázy Twinkle, také <i>C10orf2</i>
PIF1	protein s helikázovou aktivitou
POLG	gen katalytické podjednotky polymerázy γ
POLG2	gen přídatné podjednotky polymerázy γ
POLRMT	mitochondriální RNA polymeráza
POLγA	katalytická podjednotka polymerázy γ
POLγB	přídatná podjednotka polymerázy γ
PS	Pearsonův syndrom
RecA	rekombináza <i>E. coli</i>
RecB	podjednotka exonukleázy RecBCD <i>E. coli</i>
RITOLS	ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand; model inkorporace ribonukleotidů v celém opoždujícím se řetězci
RNA	ribonukleotidová kyselina
RNAi	RNA interference
RNASEH1	gen RNázy H1
RNáza H1	protein štěpící ribonukleotidové řetězce v hybridních RNA-DNA dvouřetězcových molekulách
RNáza H2	protein štěpící ribonukleotidové řetězce v hybridních RNA-DNA dvouřetězcových molekulách fungující výhradně v jádru
RPO41	gen mitochondriální RNA polymerázy u <i>S. cerevisiae</i>
rRNA	ribozomální RNA
SANDO	sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia; senzorická ataxie, neuropatie, dysartrie a oftalmoplegie
SCAE	spino-cerebellar ataxia-epilepsy syndrome; syndrom spino-cerebelární ataxie a epilepsie
SDM	strand displacement model; model vytěšňování řetězce
SF4	superfamily 4, superrodina primáz/helikáz č. 4
SLC25A19	gen proteinu DNC
SSB	single strand binding protein; protein vázající jednořetězcovou DNA
ssDNA	single-stranded DNA, jednořetězcová DNA
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A
TFB2M	mitochondriální transkripční faktor B2
TIM	translocase of the inner membrane; translokáza vnitřní membrány

TK2	thymidinkináza 2
TOM	translocase of the outer membrane; translokáza vnější membrány
TP	thymidinfosforyláza
tRNA	transferová RNA
VDAC	voltage-dependent anion channel; napětově závislý aniontový kanál
yDna2	kvasinkový protein s ATPázovou, helikázovou a nukleázovou aktivitou

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	STAVBA A FUNKCE MITOCHONDRÍ.....	2
2.1	Stavba a dynamika mitochondrií.....	2
2.2	Komplexy elektron-transportního řetězce a ATPsyntáza.....	6
3	MITOCHONDRIÁLNÍ GENOM, NUKLEOID	9
3.1	Stavba mitochondriálního genomu a nukleoidu.....	9
3.2	Modely replikace mtDNA	11
3.2.1	<i>Strand-displacement model</i>	11
3.2.2	<i>Strand coupled model</i>	12
3.2.3	<i>RITOLS</i>	12
3.3	Proteiny účastníci se replikace mtDNA a jejich možná funkce při vzniku delecí.....	13
3.3.1	<i>Polymeráza γ</i>	14
3.3.2	<i>Helikáza Twinkle</i>	16
3.3.3	<i>mtSSB</i>	18
3.3.4	<i>DNA2</i>	18
3.3.5	<i>PIF1</i>	19
3.3.6	<i>RNáza H1</i>	19
3.3.7	<i>POLRMT</i>	19
3.3.8	<i>MGME1</i>	20
4	NUKLEOTIDOVÝ METABOLISMUS A VLIV JEHO PROTEINŮ NA VZNIK MTDNA DELECÍ.....	21
4.1.1	<i>ANT1</i>	21
4.1.2	<i>TK2</i>	21
4.1.3	<i>DGUOK</i>	22
4.1.4	<i>DNC</i>	22
4.1.5	<i>TP</i>	22
5	ROZLOŽENÍ DELECÍ V MITOCHONDRIÁLNÍM GENOMU	24
6	ZÁVĚR	26
7	POUŽITÁ LITERATURA	27

1 Úvod

Mitochondriální onemocnění jsou heterogenní skupinou onemocnění způsobených mutacemi jak mitochondriálního (viz kapitola 3.1), tak jaderného genomu. První patogenní mutace mitochondriální DNA byly identifikovány v roce 1988 (Holt et al. 1988; Wallace et al. 1988), následovány objevem mnoha změn jak mitochondriální, tak jaderné DNA (mtDNA, resp. nDNA) způsobujících onemocnění lidí ale například i rostlin (Newton & Coe 1986). Příčinami vzniku mitochondriálních poruch mohou být především neschopnost produkce dostatečného množství energie (ve formě ATP) pro pohánění buněčných pochodů v důsledku narušení funkce komplexů dýchacího řetězce nebo ATPsyntázy (viz kapitola 2.2), ale také porušená homeostáza vápníku, regulace apoptózy nebo nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku (Ylikallio & Suomalainen 2012). Prevalence těchto nemocí je zhruba 1 : 4300 (Gorman et al. 2015) a jedná se o rychle se rozvíjející obor medicíny a výzkumu s jedním až dvěma novými jadernými geny s podílem na vzniku mitochondriálního onemocnění objevenými každý měsíc (Chinnery 2015). Na rozdíl od jaderného genomu se mitochondriální DNA vyskytuje v buňce v mnoha kopiích (viz kapitola 3) a mutace je tak obvykle přítomna jen v části těchto molekul, tento stav se nazývá heteroplasmie. Negativní důsledky se obvykle začnou projevovat od určitého hraničního zastoupení mutovaných molekul, přičemž tato hraniční hodnota je pravděpodobně různá pro různé tkáně a orgány a odhaduje se na 75–90 % (Taylor & Turnbull 2005). Za nejcitlivější je považován centrální nervový systém, srdeční a kosterní svalovina, ledviny, endokrinní systém a játra. Příkladem vlivu úrovně heteroplasmie je mutace m.8993T>G v genu *MT-ATP6*, která má mírné nebo žádné projevy při heteroplasmii nižší než 60 %, zatímco při zastoupení 70–90 % způsobuje neurogenní slabost s ataxií a retinitis pigmentosa (NARP) a při 90% heteroplasmii závažnější Leighův syndrom (Thorburn & Rahman 1993). Mitochondriální mutace s úrovní heteroplasmie vyšší než 1 % se vyskytují u 0,5–1 % lidské populace (Elliott et al. 2008).

V tuto chvíli neexistuje dobře fungující terapie naprostě většiny mitochondriálních onemocnění a léčba se soustředí na potlačení symptomů. Mezi výjimky patří například použití koenzymu Q₁₀ v terapii poruch jeho tvorby (Di Giovanni et al. 2001), jeho analogu EPI-743 při léčbě některých dětských mitochondriálních onemocnění (Enns et al. 2012), kreatin monohydrátu (Tarnopolsky 2011) nebo jeho kombinace s koenzymem Q₁₀ a kyselinou lipoovou (Rodriguez et al. 2007), či arginu v případě onemocnění doprovázených nedostatečností tvorby oxidu dusnatého (Koga et al. 2007).

Mutační rychlost mitochondriální DNA je výrazně rychlejší než u jaderného genomu (Santos et al. 2002), a například právě na výskytu delecí mtDNA bylo ukázáno, že množství mutací mitochondriálního genomu se zvyšuje s věkem (Khrapko et al. 1999). Poruchy mitochondriální funkce navíc zřejmě ovlivňují patologie nemocí, jako jsou rakovinné bujení nebo neurodegenerativní onemocnění, např. Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba (Nunnari & Suomalainen 2012).

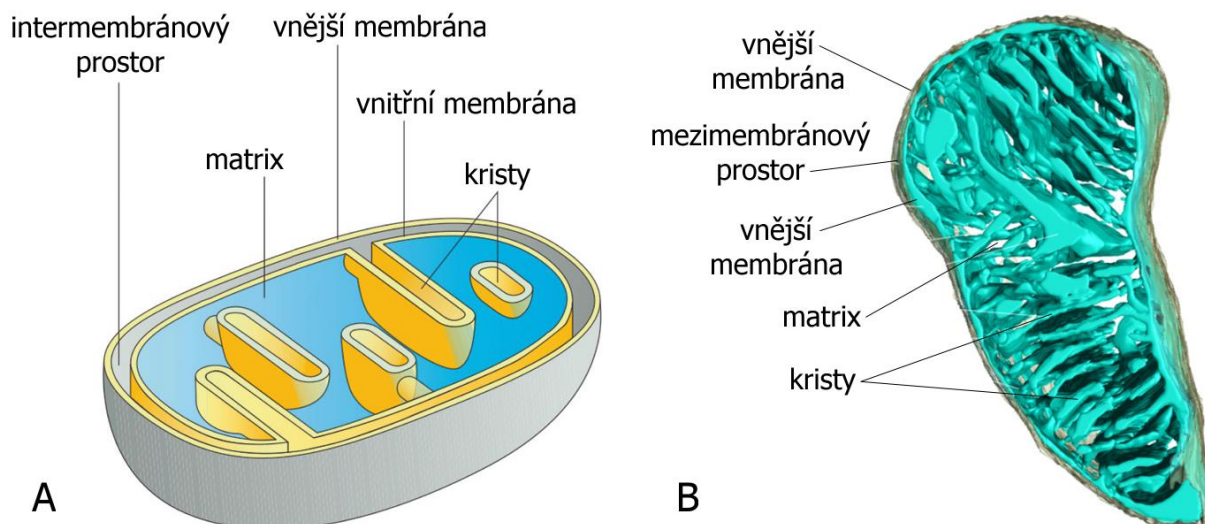
2 Stavba a funkce mitochondrií

2.1 Stavba a dynamika mitochondrií

Mitochondrie jsou semiautonorní orgány eukaryotních buněk, které vznikly před zhruba 1,6 miliardou let endosymbiózou gramnegativní alfa-proteobakterie předkem dnešní eukaryotní buňky (Kuhlbrandt 2015; Sagan 1967). V buňce plní rozmanité funkce jako je produkce NADH a GTP v citrátovém cyklu, biosyntéza aminokyselin, hemových skupin, železosírných komplexů nebo fosfolipidů buněčných membrán. Dále se uplatňují v signalizaci vápenatých iontů (Rizzuto et al. 2012) a obecně buněčné signalizaci (Chandel 2014), např. v procesech programované buněčné smrti (Li et al. 1997). Dále se uvažuje o funkci mitochondrií v procesu stárnutí (Bender et al. 2006; Bratic & Larsson 2013; Khrapko et al. 1999).

Hlavní funkcí mitochondrií je však produkce adenosintrifosfátu (ATP), vysokoenergetické molekuly používané k pohánění ostatních buněčných funkcí, jako je například biosyntéza, skládání a degradace proteinů, dělení, tvorba a udržování membránových potenciálů nebo mechanická práce např. svalových buněk. Mitochondrie dospělého člověka vyprodukují denně kolem 50 kg ATP (Kuhlbrandt 2015). ATP je v mitochondriích produkováno v procesu oxidativní fosforylace (OXPHOS) při němž je kyslík redukován na vodu elektrony z NADH a FADH_2 vznikajících v Krebsově cyklu za současného transportu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix do mezimembránového prostoru. Vzniklý gradient protonů je využit k syntéze ATP (Krebs & Johnson 1937; Mitchell 1961; Mitchell 2011) (viz kapitola 2.2).

Mitochondrie jsou orgány se dvěma membránami (Obr. 1). Vnější mitochondriální membrána vznikla z vnější membrány gramnegativní bakterie, předka dnešní mitochondrie. Je hladká bez záhybů a propustná pro ionty a malé nenabitě molekuly přes poriny jako např. napětově závislý aniontový kanál VDAC (voltage-dependent anion channel) (Bayrhuber et al. 2008). Větší molekuly, zejména proteiny, se přes ni dostávají v nesbalené podobě pomocí importních systémů (viz dále). Naproti tomu vnitřní mitochondriální membrána je nepropustná pro ionty i malé molekuly, což je důležité pro její funkci při udržování gradientu protonů. Je také zprohýbaná do útvarů zvaných kristy (Sjostrand 1953), které mohou mít tvar úzkých tubulů s průměrem okolo 30–40 nm až plochých lamel v případě lidských buněk (Mannella 2006). Dohromady tyto membrány vymezují tři další kompartmenty v rámci mitochondrie. Vnitřní membrána obaluje prostor zvaný mitochondriální matrix, v němž je uložena mitochondriální DNA, dochází zde k transkripci a translaci mitochondriálních genů a důležitým metabolickým procesům včetně Krebsova cyklu (Krebs & Johnson 1937). Intermembránový prostor mezi vnitřní a vnější membránou je ekvivalentem periplasmy gramnegativních bakterií. Jedná se o zhruba 20 nm širokou skulinu mezi oběma membránami (Kuhlbrandt 2015), která je spojena se třetím kompartmentem, lumenem krist, pomocí otvorů, které mohou mít různý tvar i velikost, od kulatých otvorů s průměrem okolo 25 nm u postmitotických buněk srdce a jater (Perkins & Frey 2000) až po štěrbinu zhruba 25 nm široké a až 100 nm dlouhé u často se dělících např. kvasinkových buněk (Gold et al. 2014).



Obrázek 1: Membránové kompartmenty mitochondrie – schéma (A) a tomografický snímek mitochondrie z myšího srdce (B). Vnější membrána šedě, vnitřní membrána světle modře. Upraveno dle (Kuhlbrandt 2015).

Membrána krist je zprohýbaná pro zvětšení povrchu a v tkáních s vysokými energetickými nároky, jako jsou kosterní nebo srdeční svalovina, mají kristy tvar plochých lamel hustě poskládaných na sebe, zatímco například v buňkách ledvin či jater jsou mezery mezi nimi větší a relativní objem matrix se zvětšuje (Kuhlbrandt 2015). Kristy jsou k vnější membráně přichyceny komplexem pěti membránových a jednoho rozpustného proteinu nazývaným MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) (Harner et al. 2011), který pravděpodobně zároveň zabraňuje laterální difúzi membránových proteinů a membrána krist tak obsahuje přinejmenším většinu proteinových komplexů OXPHOS, zatímco zbytek vnitřní membrány obsahuje například komponenty proteinové translokázy (viz dále) (Davies et al. 2011). Podíl na organizaci krist mají také oligomery ATPsyntázy nacházející se na jejich okrajích ve dvojitých řadách (viz kapitola 2.2).

Jedním z důležitých důkazů endosymbiotického původu mitochondrií je přítomnost mimojaderné mitochondriální DNA (mtDNA) v jejich matrix. Ta je u člověka kruhová o délce 16569 bp a obsahuje 13 genů kódujících podjednotky komplexů OXPHOS, 22 tRNA a 2 rRNA (Andrews et al. 1999) (viz kapitola 3.1). V matrix mitochondrií tak dále probíhá replikace mtDNA, transkripce a translace, úpravy rRNA. Skládají se zde mitochondriální ribosomy z rRNA kódované mtDNA a proteinů kódovaných jaderným genomem a importovaných z cytoplasmy (Fung et al. 2013). Stavba mtDNA, stejně jako proteinů účastnících se genové exprese mitochondrií odkazuje na původ organely. Zatímco proteiny účastnící se procesu translace a některé proteiny podjednotek ribozomu mají homology u bakterií (Christian & Spremulli 2012), proteinový aparát replikace a transkripce mtDNA má svůj původ mezi bakteriofágy (Lecrenier et al. 1997) (viz kapitola 3.3).

Mitochondrie bývají zobrazovány jako individuální organely ovoidního tvaru, ve skutečnosti však dochází k jejich neustálému dělení a splývání a ve většině tkání, především pak v mladších dělicích se buňkách, mají spíše dynamickou síťovitou strukturu (Lackner 2014). Dělení a splývání mitochondrií je zajištěno vysoce konzervovanou skupinou proteinů zvaných DRP (dynamin-related protein), které se

za hydrolýzy GTP účastní remodelace různých buněčných membrán (Faelber et al. 2013). DRP proteiny mají svůj původ u bakterií, kde se zřejmě také účastní procesů souvisejících s buněčnými membránami (Low et al. 2009). Dělení mitochondrií je u savců katalyzováno jediným DRP proteinem jménem DRP1 (Dnm1 u kvasinky) za účasti proteinů MFF a FIS1 (Mozdy et al. 2000; Otera et al. 2010). DRP1 zřejmě tvoří helikální struktury na vnějším povrchu mitochondrií v místech dělení (Ingelman et al. 2005) a za hydrolýzy GTP je zaškrcuje a způsobuje oddělení vnitřní i vnější membrány (Frohlich et al. 2013).

Velkou roli hraje při dělení mitochondrií endoplasmatické retikulum při takzvaném dělení mitochondrií asociovaném s ER (ERMD – ER-associated mitochondrial division), při němž tubuly ER obalují mitochondrie a zřejmě tak označují místa dělení (Friedman et al. 2011). Splývání mitochondrií je zajišťováno proteiny OPA1 (Mgm1 u kvasinky) a mitofusinem 1 a 2 (MFN1/MFN2, Fzo1 u kvasinky) (Meeusen et al. 2004).

Stavba mitochondriální sítě souvisí s funkcí, ztráta bioenergetické funkce mitochondrií vede k rozpadu síťovitého uspořádání, což pravděpodobně souvisí se ztrátou transmembránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně (Legros et al. 2004). Při ní dochází k zastavení splývání mitochondrií štěpením OPA1 metaloproteázou OMA1 (Head et al. 2009). Splývání mitochondrií může mimo jiné sloužit k výměně obsahu matrix mezi mitochondriemi, včetně mRNA, kdy může poskytovat částečnou ochranu i proti účinkům kumulujících se mutací mtDNA v některých mitochondriích (Chen et al. 2010), případně k tlumení přechodných stresů nebo kompenzaci některých defektů např. ETC komplexu IV (viz kapitola 2.2)(Chen et al. 2007; Rolland et al. 2013). K rozpadu mitochondriální sítě v důsledku převažujícího dělení dochází při některých neurodegenerativních onemocněních (Song et al. 2011; Wang et al. 2009) a u stárnoucích buněk, zabránění procesu dělení však částečně potlačí projevy onemocnění i stárnutí u modelových buněčných linií (Cui et al. 2010; Scheckhuber et al. 2007). V případě hladovějících buněk funguje fúze mitochondrií jako stérická obrana proti autofagii (Rambold et al. 2011).

S dynamikou mitochondrií souvisí i konkrétní mitochondriální onemocnění u lidí. Mutace v genu *OPA1* způsobují na jedné straně autosomálně dominantní atrofii optického nervu (Delettre et al. 2000), ale také (u zhruba 20% pacientů) multisystemická mitochondriální onemocnění, kde atrofii *nervi optici* doprovází hluchota, ptóza, oftalmoplegie, ataxie a periferní neuropatie v pozdějších fázích života (Yu-Wai-Man et al. 2010). Zároveň dochází k delecím v mtDNA příčně pruhované svaloviny, což vysvětluje mozaikovitě poruchy ETC komplexu IV (Yu-wai-man et al. 2010). Většina mutací *OPA1* způsobujících delece mtDNA leží v oblasti odpovídající katalytické GTPázové doméně proteinu (Amati-Bonneau et al. 2008; Milone et al. 2009), je tedy možné, že právě narušení funkce hydrolýzy GTP by mohlo být příčinou sekundárních mutací mtDNA způsobených nerovnováhou v koncentracích deoxyribonukleotidů v organele. Mutace *MFN2* zase způsobuje syndrom Charcot-Marie-Tooth typu 2A (CMT2A), autosomálně dominantně dědičnou neuropatii (Zuchner et al. 2004). Experimentální vyřazení (knockout) *MFN1* a *MFN2* pak vede ke snížení množství mtDNA (Chen et

al. 2011) podobně jako narušení dělení mitochondrií RNA interferencí DRP1 (Parone et al. 2008). Knockout DRP1 v myších neuronech vede k poruchám vývoje axonů a synapsí (Ishihara et al. 2009) a zatímco u zdravých savčích buněk jsou nukleoidy obsahující mtDNA (viz kapitola 3.1) lokalizovány v místech budoucího dělení, popř. na koncích již rozdělených mitochondrií (Iborra et al. 2004), v nepřítomnosti DRP1 dochází k jejich agregaci v rámci hyperfúzní mitochondriální sítě (Ban-Ishihara et al. 2013).

Transport mitochondrií v rámci buňky savců je zajišťován proteiny MIRO1 a MIRO2, což jsou GTPázy připojující mitochondrie ke kinesinovému adaptorovému proteinu Milton/TRAK a umožňující jejich pohyb po mikrotubulárním cytoskeletu (Glater et al. 2006). Miro má GTPázovou doménu a Ca^{2+} vázající doménu a inhibuje pohyb mitochondrií při zvyšující se koncentraci vápenatých iontů (Wang & Schwarz 2009). Zdá se, že na pohybu mitochondrií se nějakým způsobem podílí také MFN2, který je v přímém kontaktu s Miro a Milton/TRAK (Misko & Jiang 2010).

Mitochondrie savců obsahují přes 1 500 různých proteinů, v závislosti na tkáni (Forner et al. 2006), např. podjednotky komplexů OXPHOS, jejich assembly faktory, proteiny replikace a transkripce, ribosomální proteiny a translační faktory, enzymy Krebsova cyklu, beta-oxidace, tvorby železosírných komplexů aj. Jedná se o směs proteinů prokaryotního původu od endosymbionta a proteinů eukaryotního původu hostitelských (Gabaldon & Huynen 2004). Lidská mtDNA však kóduje pouze 13 proteinů, hydrofobních podjednotek ETC komplexů a ATPsyntázy (Andrews et al. 1999). V průběhu evoluce tak kromě ztráty mnoha genů a jejich proteinových produktů došlo k transferu až 99% genů z vyvíjejících se mitochondrií do jaderného genomu (Gabaldon & Huynen 2004). Tyto a mitochondriální proteiny eukaryotického původu jsou transkribovány v jádře a k jejich translaci dochází na cytoplasmatických ribozomech, do jednotlivých kompartmentů mitochondrie tak musí být aktivně transportovány (Schmidt et al. 2010). K tomuto účelu mají amino-terminální signální sekvence, které jsou odštěpeny v průběhu importu. Import zajišťují proteinové komplexy včetně TOM (translocase of the outer membrane, translokáza vnější membrány) a TIM (translocase of the inner membrane, translokáza vnitřní membrány). V cytosolu jsou mitochondriální proteiny udržovány v rozbaleném stavu s pomocí chaperonů, dokud není jejich signální sekvence rozpoznána komplexem TOM (MacKenzie & Payne 2007). Při transportu do matrix nebo vnitřní mitochondriální membrány překlenuje komplex TOM a TIM intermembránový prostor a zdá se, že je držen pohromadě transportovaným polypeptidem (Gold et al. 2014). K tomuto transportu je využíván elektrochemický potenciál na vnitřní mitochondriální membráně (Schmidt et al. 2010). Import proteinů do mitochondrií je regulován fosforylací importních proteinů cytosolickými kinázami (Schmidt et al. 2011). U kvasinek bylo zjištěno, že mRNA jaderně kodovaných mitochondriálních proteinů jsou lokalizovány poblíž vnější mitochondriální membrány a koordinovaně translatovány (Gadir et al. 2011), detaily tohoto procesu však nejsou zatím zcela známy. Existují také poruchy importu způsobující lidská mitochondriální onemocnění, jejichž příčinou může být mutace způsobující aminokyselinovou záměnu

v signální sekvenci preproteinu, změny importních komplexů nebo chaperonů zajišťujících správné skládání proteinů po jejich translokaci do mitochondrie (MacKenzie & Payne 2007).

2.2 Komplexy elektron-transportního řetězce a ATPsyntáza

Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba energeticky bohaté sloučeniny adenosintrifosfátu (ATP) především v procesu oxidativní fosforylace (OXPHOS), používané k pohánění buněčných funkcí včetně pohybu (například při svalové kontrakci), syntézy, skládání a odbourávání proteinů, udržování membránových potenciálů aj. ATP se v těle dospělého člověka vytvoří a opět rozštěpí na adenosindifosfát a anorganický fosfát okolo 50 kg denně (Kuhlbrandt 2015). Oxidativní fosforylace je zajišťována čtyřmi komplexy elektron-transportního řetězce (ETC) a pátým komplexem ATPsyntázy ((F₁F₀-ATPsyntáza) (Hatefi 1985) ve vnitřní mitochondriální membráně. Z NADH vytvořeného v Krebsově cyklu jsou elektrony předávány komplexu I (NADH:ubichinon-oxidoreduktáza) a z něj potom na ubichinon za současného transportu čtyř protonů z matrix do intermembránového prostoru. Komplex II (sukcinátdehydrogenáza) předává elektrony oxidace sukcinátu na ubichinon bez transferu protonů přes membránu. Komplex III (ubichinol:cytochrom-c-oxidoreduktáza) odebírá elektrony z ubichinonu a předává je na cytochrom c, solubilní protein intermembránového prostoru, a současně pumpuje jeden proton přes membránu. Z cytochromu c přechází elektrony přes komplex IV (cytochrom-c-oxidáza) na svůj terminální akceptor, molekulový kyslík, za tvorby molekuly vody, což přispívá k tvorbě protonového gradientu spotřebou čtyř protonů matrix na molekulu kyslíku (Kuhlbrandt 2015).

Komplex I funkčně spřahuje přesun elektronů z NADH na ubichinon s přenášením protonů z matrix do mezimembránového prostoru se stechiometrií čtyř protonů na dva elektrony (Galkin et al. 2006). Jedná se o největší komplex ETC o hmotnosti zhruba 550 kDa u bakterií po zhruba 1 000 kDa u savců. Napříč organismy má tvar písmene L s membránovým a periferním ramenem (Clason et al. 2010; Guenebaut et al. 1998). Obsahuje 14 centrálních podjednotek konzervovaných od bakterií po savce, u nichž obsahuje celkem 45 podjednotek (Zhu et al. 2016). Čtrnáct centrálních podjednotek lze rozdělit na sedm hydrofilních a sedm hydrofobních, přičemž hydrofobní centrální podjednotky jsou u lidí a většiny eukaryot kódovány v mtDNA (Wirth et al. 2016). Všechny reakce přenosu elektronů probíhají v periferním ramenu, kde je lokalizováno 9 kofaktorů, mezi nimiž jsou elektrony předávány (flavin-mononukleotid (FMN) a osm železosírných komplexů) (Wirth et al. 2016). Primárním akceptorem elektronu z NADH je FMN v 51kDa podjednotce (NDUFV1) a odtud jsou elektrony předávány mezi železosírnými komplexy až ke konečnému komplexu N2 a odtud na ubichinon (Wirth et al. 2016; Zhu et al. 2016). Redukce ubichinonu spustí přenos protonů podjednotkami membránového ramene (Brandt 2011). Existují i nemoci způsobené mutacemi genů podjednotek komplexu I, způsobující například atrofii optického nervu u dospělých nebo encephalopatii u dětí (Morris et al. 1996; Wallace et al. 1988).

Komplex III, neboli ubichinol:cytochrom-c-oxidoreduktáza (také cytochrom bc₁) je strukturně homodimer, kde každý monomer je tvořen jedenácti různými podjednotkami (Hunte et al. 2000). Pouze v dimerickém stavu je aktivní (Covian & Trumpower 2005) a byl tak pozorován v superkomplexech ETC (viz dále). Savčí komplex IV se skládá z 13 podjednotek (Tsukihara et al. 1996), z nichž čtyři centrální jsou konzervovány od bakterií (Svensson-Ek et al. 2002).

Komplex V neboli F₁F₀-ATP syntáza má dvě domény, transmembránovou F₀ doménu ve vnitřní membráně, která za fyziologického stavu přesouvá protony po elektrochemickém gradientu na vnitřní membráně z mezimembránového prostoru do matrix, a katalytickou doménu F₁ v matrix. Celý komplex má hmotnost zhruba 600 kDa a obě domény jsou propojeny centrálním a periferním stonkem (Rubinstein et al. 2003). ATP syntáza bakterií a chloroplastů se skládá z osmi různých podjednotek, přičemž F₁ doména obsahuje podjednotky α – ϵ se stechiometrií $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ a F₀-podjednotky ab₂c_{11–15}. Mitochondriální ATP syntáza pak obsahuje 9 dalších podjednotek. Pro stechiometrii produkce ATP a přenesených protonů je zásadní počet podjednotek c v c-prstenci F₀-domény, kterých je v případě bakterií jedenáct (Meier et al. 2005), v případě kvasinky deset (Stock et al. 1999) a osm v případě savců (Watt et al. 2010). Protony pohybující se po gradientu přes F₀ doménu roztáčí c-komplex a tento pohyb se přenáší přes centrální stonek na F₁ doménu, kde dochází ke konformačním změnám ve vazebných místech a tvorbě ATP z ADP a fosfátu (Noji et al. 1997).

Z pohledu vzájemné interakce jednotlivých komplexů ETC a způsobu předávání elektronů existují dva základní krajní modely. Jedním je takzvaný model náhodných srážek (nebo též model tekutého stavu, liquid state model, random collision model) (Hackenbrock et al. 1986), druhým pak model pevného stavu předpokládající existenci větších komplexů z jednotlivých komplexů ETC, tzv. superkomplexů (Chance & Williams 1955). Ve prospěch superkomplexů původně hovořily časté kopurifikace různých komplexů (Hatefi & Rieske 1967; Tisdale 1967) a větší účinnosti elektronového toku u rekonstituovaných proteinů při konkrétních stechiometriích jednotlivých komplexů (Fowler & Hatefi 1961; Fowler & Richardson 1963). V současné době existuje mnoho důkazů existence superkomplexů dýchacího řetězce u mnoha organismů, složitější otázkou je právě například stechiometrie jednotlivých komplexů ETC. Mezi prvními byly izolovány prokaryotní superkomplexy jak bakterií, např. *Paracoccus denitrificans* (Berry & Trumpower 1985), tak archeí, např. *Sulfolobus* sp. (Iwasaki et al. 1995). Superkomplexy ETC byly však nalezeny i v mitochondriích hub (Krause, Scheckhuber, et al. 2004), vyšších rostlin (Krause, Reifschneider, et al. 2004) i savců (Schagger et al. 2004). Byly pozorovány různé stechiometrie jako například superkomplexy kvasinek *S. cerevisiae* skládající se z dimeru komplexu III a jednoho nebo dvou komplexů IV (III₂IV₁ nebo III₂IV₁) (Heinemeyer et al. 2007), superkomplexy I₁III₂ u *Arabidopsis thaliana* (Natalia V Dudkina et al. 2005) nebo supekomplexy I₁III₂ a I₁III₂IV₁ z mitochondrií buněk hovězí srdeční svaloviny (Schafer et al. 2006; Schafer et al. 2007). V souladu s původními kinetickými studiemi nebyla pozorována asociace komplexu II (Bianchi et al. 2004).

Superkomplex I_1III_2 savců má hmotnost zhruba 1500 kDa a dimer komplexu III je v něm v kontaktu s membránovým ramenem komplexu I (Krause et al. 2005). Superkomplex $I_1III_2IV_1$ byl ze savců nalezen v mitochondriích potkanů (Reifschneider et al. 2006) a skotu (Althoff et al. 2011), ale také u vyšších rostlin (Krause, Reifschneider, et al. 2004) a hub (Krause, Scheckhuber, et al. 2004). V tomto superkomplexu jsou dimer komplexu III i monomerní komplex IV asociovány s membránovým ramenem komplexu I a zároveň jsou ve vzájemném kontaktu (Schafer et al. 2007). Celková hmotnost superkomplexu je pak okolo 1700 kDa a ve srovnání se superkomplexe I_1III_2 je aktivnější a stabilnější (Schafer et al. 2006). V komplexu I je vazebné místo chinonu v matrixovém rameni poblíž jeho spojení s membránovým ramenem (Zickermann et al. 2003), v komplexu III je vazebné místo ubichinonu v oblasti Rieskeho železosírného proteinu a cytochromu b (Covian & Trumpower 2005) a v superkomplexu jsou tyto dvě oblasti obou komplexů blízko u sebe (Schafer et al. 2007). Jednou z navrhovaných funkcí superkomplexů je tak předávání substrátu mezi komplexy (Bianchi et al. 2004) a dále například zlepšení katalytické funkce nebo zadržení reaktivních meziproductů (Schagger & Pfeiffer 2000). Vzájemná interakce komplexů je zároveň důležitá pro jejich skládání a stabilitu, například pro stabilitu komplexu I je potřeba přítomnost komplexu III u lidí (Acin-Perez et al. 2004; Schagger et al. 2004) i bakterií (Stroh et al. 2004). Pro stabilitu superkomplexů je důležitá přítomnost kardiolipinu ve vnitřní mitochondriální membráně (Pfeiffer et al. 2003), což se pravděpodobně podílí například také na patologii Barthova syndromu u lidí (McKenzie et al. 2006). S existencí superkomplexů pak také pravděpodobně souvisí sdružená dysfunkce několika komplexů ETC při různých lidských onemocněních, např. snížená aktivita komplexu I a III u pacientů s periferními arteriosklerotickými onemocněními (Brass et al. 2001) nebo deficience komplexu I a IV u pacientů s Parkinsonismem (Benecke et al. 1993) či pacientů s laktátovou acidózou (van Straaten et al. 2005).

I mitochondriální komplex V, tedy F_1F_0 -ATP syntáza, podléhá vyšší úrovni organizace. Tvoří dimery seřazené do řad podélně na trubicovitých kristách, nebo na okrajích plochých krist. Jednotlivé dimery jsou spojeny v oblasti F_0 domény pod určitým pro různé skupiny organismů specifickým úhlem (Dudkina et al. 2006; Natalya V Dudkina et al. 2005; Thomas et al. 2008) a pravděpodobně přímo zapříčiňují ohyb okrajů krist vnitřní membrány (Davies et al. 2012), což potvrzují i studie kvasinkových mutantů s nestabilními dimery komplexu V (Paumard et al. 2002).

3 Mitochondriální genom, nukleoid

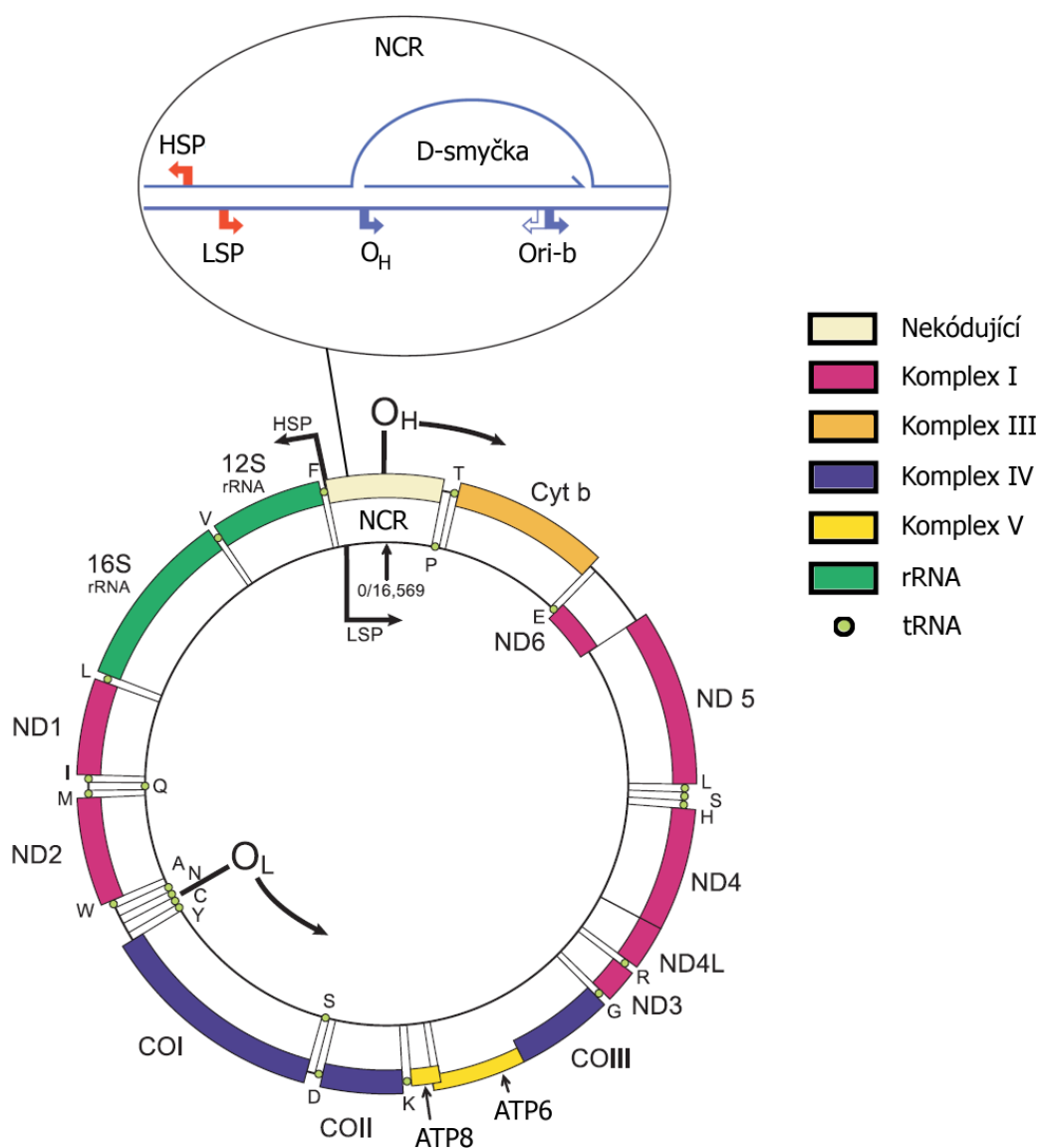
3.1 Stavba mitochondriálního genomu a nukleoidu

Prvním náznakem existence mitochondriální DNA bylo pozorování cytoplasmatické dědičnosti některých vlastností (Caspari 1955) a zjištění, že mitochondrie syntetizují proteiny (McLean et al. 1958) a RNA (Wintersberger 1964) nezávisle na jádře, později následovala izolace mtDNA z kuřecích jaterních buněk a kvasinky (Nass & Nass 1963; Schatz 1963) a poté i savčích buněk (Nass et al. 1965). S použitím elektronové mikroskopie na myších a kuřecích buňkách se ukázalo, že se jedná cirkulární molekuly o velikosti zhruba 5 μm (van Bruggen et al. 1966). Lidská mitochondriální DNA zahrnuje cirkulární dvouřetězcové molekuly s negativními nadobrátkami o velikosti 16569 párů bází obsahující 37 genů (Andrews et al. 1999) v počtu zhruba 1000–10000 kopií na buňku (Kukat et al. 2011) (Obr. 2). Třináct z těchto genů kóduje konzervované hydrofobní transmembránové proteinové podjednotky komplexů I, III a IV elektron transportního řetězce a F_1F_0 -ATP syntázy, zbývajících 24 genů pak nepřekládané RNA. Z nich 22 je tRNA, přičemž na jednu aminokyselinu připadá jeden typ tRNA kromě serinu a leucinu, které se mohou v průběhu proteosyntézy vázat na dva různé typy tRNA (Nicholls & Minczuk 2014). 2 geny pak kódují rRNA. Lidská mitochondriální DNA je velmi úsporná a prakticky neobsahuje intergenové nekódující sekvence, přičemž dva páry protein kódujících oblastí se v ní překrývají, což je v kontrastu s jaderným genomem, kde na 3 miliardy párů bází haploidního genomu připadá zhruba 20000 genů, což odpovídá hustotě zhruba 150 kbp/gen (Bogenhagen 2012). Zvláštností savčí mitochondriální DNA je nerovnoměrné rozdělení guanosinu a tyminu na jednom řetězci oproti druhému, což má za následek rozdílnou vznášivou hustotu v zásaditém gradientu CsCl, podle čehož se pak řetězce nazývají lehký (L, light) resp. těžký (H, heavy) (Clayton 2003).

Zhruba 1,1 kb molekuly lidské mtDNA zaujímá nekódující oblast (non-coding region, NCR). Rozprostírá se mezi geny pro tRNA fenylalaninu a prolinu a obsahuje promotory transkripce obou řetězců, tj. LSP (light strand promoter, promotor lehkého řetězce) a HSP (heavy strand promoter) a možný začátek replikace těžkého řetězce O_H (Nicholls & Minczuk 2014) (viz kapitola 3.2). Nemalou část NCR obvykle zaujímá třetí řetězec takzvané 7S DNA a v tomto místě se tak tvoří takzvaná D-smyčka (displacement loop neboli D-loop) (Brown et al. 1978). 7S DNA může mít různou délku zhruba okolo 650 nt (Crews et al. 1979) a vyskytuje se u zhruba 10% molekul mtDNA v případě lidských buněčných linií až po 90% u vajíček *Xenopus* (Brown et al. 1978; Hallberg 1974). Záhadou je funkce 7S DNA, vzhledem k tomu, že její poločas života je v buňkách hlodavců 45 minut až 1 hodina (Bogenhagen & Clayton 1978) a je syntetizována i při chemicky navozené depleci mtDNA (Brown & Clayton 2002). Mezi její navrhované role patří určení místa setkání replikačních vidliček, rozvolnění genomu pro replikaci a transkripci nebo interakce molekul mtDNA mezi sebou a s vnitřní mitochondriální membránou prostřednictvím proteinů vážících se na D-loop (Nicholls & Minczuk 2014).

Mitochondriální DNA je děděna maternálně a mitochondrie spermií jsou po oplození degradovány (Al Rawi et al. 2011). Rozchod mtDNA do dělicích se mitochondrií, potažmo buněk je oproti

jadernému genomu pravděpodobně jevem více stochastickým, a replikace mtDNA je nezávislá na buněčném cyklu (Birky 2001).



Obrázek 2: Organizace lidského mitochondriálního genomu – dole: vyobrazeny geny kódující proteinové podjednotky komplexů dýchacího řetězce, mitochondriální transferové RNA a ribosomální RNA (barevně), dále počátky replikace společné pro model RITOLS a SDM (O_H , resp. O_L) a promotory transkripce; nahoře: organizace nekódující oblasti (NCR) a D-smyčky se znázorněním počátku replikace těžkého řetězce modelu RITOLS, O_H a Ori-B, dále promotoru transkripce těžkého (HSP) a lehkého (LSP) řetězce. Upraveno dle (Clayton 2003; Holt & Reyes 2012)

Lidská mtDNA je v mitochondriích organisována spolu s proteiny do ovoidních útvarů o velikosti okolo 100 nm zvaných nukleoidy (Kukat et al. 2011). Byla navržena dvouvrstevná struktura nukleoidu s centrálními proteiny vázanými na mtDNA a periferní oblastí dočasně vázaných proteinů se zvláštními funkcemi (Bogenhagen et al. 2008). Mezi centrální proteiny nukleoidu savců patří především TFAM, původně charakterizovaný jako mitochondriální transkripční faktor (Fisher & Clayton 1988), který ohýbá a sbaluje mtDNA *in vitro* a zřejmě také *in vivo* v nukleoidu mitochondrií

(Kaufman et al. 2007; Ngo et al. 2011), dále například mtSSB, mitochondriální DNA polymeráza γ , mitochondriální RNA polymeráza (POLRMT) a helikáza Twinkle (Hensen et al. 2014) (viz kapitola 3.3). TFAM je protein o hmotnosti 24 kDa se dvěma HMG-box doménami (high mobility group, vysoce mobilní skupina, pův. podle vysoké pohyblivosti v elektroforetickém poli), který má důležitou roli v transkripci mtDNA (Shi et al. 2012), minimálně *in vitro* však není nezbytně zapotřebí (Shutt et al. 2011), naopak nadexprese vede k inhibici transkripce (Maniura-Weber et al. 2004). Zdá se však, že má funkci regulace množství mtDNA (Ekstrand et al. 2004) (a sám je naopak regulován Lon proteázou (Matsushima et al. 2010)) a její údržby a vyřazení jedné jeho kopie v genomu myši vede ke snížení obsahu mtDNA, zatímco deaktivace obou kopií má za následek embryonální letalitu u myši (Freyer et al. 2010; Larsson et al. 1998). Zatím však nejsou známa mitochondriální onemocnění způsobená poruchou jeho funkce (Holt & Reyes 2012).

3.2 Modely replikace mtDNA

Replikaci lidské mtDNA podle všeho zajišťuje jediná DNA polymeráza označená polymeráza γ (Ropp & Copeland 1996). Bylo navrženo několik modelů replikace mitochondriální DNA, pro něž existuje různé množství důkazů.

3.2.1 *Strand-displacement model*

Model vytěsňování řetězce, neboli strand-displacement model (SDM) byl prvním navrhovaným modelem replikace mtDNA (Robberson et al. 1972). V tomto modelu začíná replikace těžkého řetězce (viz kapitola 3.1) z vlastního počátku replikace nazývaného O_H v oblasti NCR a pokračuje za současného vytěsňování druhého řetězce v jedno vláknové podobě. Podle SDM je v tuto chvíli druhý řetězec zcela pokrytý mtSSB proteinem, a tak je zabráněno tvorbě nespecifických primerů či poškození DNA apod. (Miralles Fuste et al. 2014). Zhruba ve dvou třetinách kruhové molekuly, v oblasti pěti nahloučených genů pro tRNA, mezi geny tRNA asparaginu a cysteinu helikáza Twinkle rozvine oblast replikačního počátku lehkého řetězce (O_L), která se uspořádá do struktury kličky. Tak je zabráněno vazbě mtSSB a tato struktura je rozpoznána mitochondriální RNA polymerázou (POLRMT, viz kapitola 3.3.7), která syntetizuje primer z polydT oblasti v jednovláknovém úseku kličky (Fuste et al. 2010). Replikační počátky těžkého a lehkého řetězce tak rozdělují molekulu mtDNA na tzv. velký a malý oblouk. Samotné umístění těchto replikačních počátků nezávisle na uvažovaném modelu replikace však není zcela jisté. Za O_H je nejčastěji považován nukleotid číslo 191 (Crews et al. 1979), existují však i důkazy pro alternativní počátky například na nukleotidu 57 (Fish et al. 2004), nukleotidu 16197 (Yasukawa et al. 2005) nebo v okolí nukleotidu 300 (Pham et al. 2006). Nejsou vyloučeny ani alternativní replikační počátky lehkého řetězce (Brown et al. 2005; Seligmann 2010; Seligmann et al. 2006). Strand-displacement model má poměrně širokou experimentální podporu (Miralles Fuste et al. 2014; Nass 1980; Reyes et al. 2009) a sdílí jistou podobnost například s replikací některých plasmidů (Khan 1997).

3.2.2 *Strand-coupled model*

Alternativou k SDM je takzvaný synchronní model, neboli strand-coupled model (Holt et al. 2000). V tomto modelu začíná replikace obousměrně z širší oblasti pojmenované OriZ (Bowmaker et al. 2003) a pokračuje současně kontinuální syntézou vedoucího řetězce a diskontinuální syntézou a následnou ligací opožďujícího se řetězce z jednotlivých Okazakiho fragmentů. První pozorování dvouřetězcových replikačních intermediátů byla provedena před téměř padesáti lety (Kirschner et al. 1968) a pozdější studie přinesly další důkazy na podporu tohoto modelu (Reyes et al. 2005; Yang et al. 2002), byly však do značné míry limitovány použitými metodami a ve své době částečně také neexistencí posledního navrhovaného modelu.

3.2.3 *RITOLS*

Model inkorporace ribonukleotidů v celém opožďujícím se řetězci (ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand, RITOLS) předpokládá jednosměrnou kontinuální replikaci vedoucího řetězce, zatímco templát opožďujícího se řetězce je pokryt komplementárními úseky RNA (Yasukawa et al. 2006). Ty by měly být 200–600 nukleotidů dlouhé (Yasukawa et al. 2006) a podle některých studií pokrývají templát opožďujícího se řetězce zcela nebo téměř zcela bez mezer (Pohjoismaki et al. 2010). Poněkud nejasný je původ těchto molekul RNA, mezi navrhované modely patří jejich tvorba pomocí enzymu primázy, která by je syntetizovala jakožto dlouhé „primery“, nebo jejich vznik z upravených transkriptů, které by poté nasedly na jednořetězcový úsek DNA při replikaci. S SDM tento model sdílí počátek replikace opožďujícího se řetězce, z něhož by mělo docházet k nahrazování RNA za DNA opožďujícího se řetězce, v modelu RITOLS však existují dva počátky replikace vedoucího řetězce, oba ležící v oblasti NCR (Yasukawa et al. 2006). Bylo navrženo i možné využití komplementární RNA po úpravě jakožto primerů pro diskontinuální syntézu druhého řetězce, a přestože na podporu této hypotézy neexistují přesvědčivé důkazy, zdá se, že mitochondrie obsahují potřebné proteiny pro zpracování takto vzniklých Okazakiho fragmentů (Holt 2009). Jako výhoda tohoto modelu se jeví omezení jednovláknových intermediátů replikace, a to především v případě, že by řetězec RNA vznikal úpravou transkriptu, kdy by se délka jednovláknového úseku omezila i ve srovnání s replikací jaderného genomu. Další výhodou je pak hypotetická možnost opravy poškození templátu opožďujícího se řetězce podle komplementárního řetězce RNA, přičemž mitochondriální polymeráza γ má schopnost reverzní transkripce jednotlivých nukleotidů (Kasiviswanathan & Copeland 2011), nebo zabránění srážkám transkripčního a replikačního aparátu (Pomerantz & O'Donnell 2010). Nevýhodou by pak mohla být malá rychlost, přičemž replikace relativně malé molekuly mtDNA skutečně trvá zhruba jednu hodinu (Clayton 1982), a v případě použití upravených transkriptů i nemožnost využití tohoto mechanismu u většiny jiných než mitochondriálních genomů.

3.3 Proteiny účastnící se replikace mtDNA a jejich možná funkce při vzniku delecí

V některých případech se u pacientů vyskytuje stejná delece obvykle většího rozsahu v určité části molekul mtDNA v dané tkáni, podle úrovně heteroplasmie. Ta obvykle vzniká samovolně a tento stav bývá doprovázen jedním ze tří nejdůležitějších syndromů, progresivní externí oftalmoplegií (PEO, viz kapitola 3.3.1) (Moraes et al. 1989), Kearnsovým-Sayreovým syndromem (KSS) (Kearns & Sayre 1958; Zeviani et al. 1998) nebo Pearsonovým syndromem (PS) (Pearson et al. 1979; Rotig et al. 1989). Dědičnost je v tomto případě maternální, nebo je jejich výskyt sporadický. U jiných pacientů se vyskytují mnohačetné delece mtDNA různé délky a polohy s dědičností obvykle autosomální. Patologické projevy delecí jsou zřejmě způsobeny nedostatkem tRNA potřebných pro mitochondriální proteosyntézu (Nakase et al. 1990).

Hlavními příčinami vzniku posledně jmenovaných delecí se zdají být zastavení postupu replikační vidlice (replication stalling) zvláště v homopolymerních úsecích DNA (Goffart et al. 2009; Wanrooij et al. 2004). To může vést k dvouřetězcovým zlomům (double-strand breaks, DSBs) ve snaze o obnovení postupu replikace (Michel et al. 1997), přičemž bylo ukázáno, že DSBs mohou vést ke vzniku delecí v mitochondriální DNA (Srivastava & Moraes 2005). Právě homopolymerní úseky často obklopují deletované oblasti mtDNA u pacientů s adPEO (Wanrooij et al. 2004) a příčinou toho, že k zastavení replikačního aparátu a vzniku delecí dochází především v těchto oblastech, se zdá být lokální nerovnováha koncentrací dNTPs, prekurzorů syntézy nového řetězce DNA (Ashley et al. 2007). Zřejmě proto nejčastějšími kauzálními příčinami mitochondriálních onemocnění spojených s delecemi v mtDNA bývají mutace v genech proteinů replikační vidličky, které je pravděpodobně činí k těmto vlivům citlivějšími, a v genech proteinů zajišťujících metabolismus nukleotidů v mitochondriích (viz kapitola 4). Bylo experimentálně ukázáno, že poruchy proteinů replikačního aparátu vedou k zástavám postupu replikační vidličky právě v oblastech homopolymerních repetitiv (Krasilnikov et al. 1997). Z těchto důvodů se následující kapitola zabývá jednotlivými proteiny replikačního aparátu a jejich možnými mutacemi způsobujícími lidská mitochondriální onemocnění spojená s delecemi v mtDNA.

Pro replikaci DNA do délky odpovídající velikosti mitochondriálního genomu člověka stačí *in vitro* přítomnost templátu a čtyř různých proteinů, kterými jsou polymeráza γ (fungující ve formě heterotrimeru složeného se dvou různých samostatných proteinových podjednotek, POL γ A a POL γ B, viz kapitola 3.3.1), mitochondriální replikativní helikáza Twinkle, mitochondriální protein vázající jednořetězcovou DNA mtSSB a mitochondriální RNA polymeráza POLRMT (Korhonen et al. 2004). O dalších proteinech je známo, že jsou potřeba k úspěšné replikaci *in vivo*, například RNáza H1 (Cerritelli et al. 2003), DNA ligáza III (Simsek et al. 2011) nebo topoisomeráza. Zajímavý je pak původ hlavních proteinů replikace mtDNA, kdy polymeráza γ , helikáza Twinkle a mitochondriální RNA polymeráza vykazují homologie s gp5 DNA polymerázou, gp4 primázou-helikázou a gp1 RNA

polymerázou bakteriofága T7, zatímco mtSSB se zdá být homologní bakteriálnímu proteinu SSB (Shutt & Gray 2006a).

3.3.1 Polymeráza γ

DNA polymeráza γ je jediná známá mitochondriální DNA polymeráza savčích buněk (Bebenek & Kunkel 2004; Ropp & Copeland 1996) (na rozdíl od některých jednobuněčných eukaryot, u nichž bylo objeveno více mitochondriálních DNA polymeráz, např. čtyři u trypanosom (Klingbeil et al. 2002)), jejíž původ lze vystopovat k polymerázám bakteriofágů (Tiranti et al. 1997). Holoenzym savčí polymerázy γ funguje jako heterotrimer o hmotnosti přibližně 245 kDa složený z jedné katalytické podjednotky POL γ A o hmotnosti přibližně 140 kDa (kodovaná genem *POLG* na lokusu 15q25) a homodimeru přídatných podjednotek o hmotnosti přibližně 110 kDa (POL γ B, kodovaná genem *POLG2* na lokusu 17q24.1) (Lee et al. 2009). Katalytická podjednotka POL γ A obsahuje tři polymerázové motivy a 3'→5'-exonukleázovou doménu a vykazuje 5'→3'-polymerázovou, 3'→5'-exonukleázovou (opravnou, tzv. proofreading) a 5'-dRP-lyásovou aktivitu (Graziewicz et al. 2006). Kontakt katalytické podjednotky s oběma podjednotkami homodimeru POL γ B není stejný, přičemž výraznější je s monomerem k POL γ A bližším, proximálním, který zvyšuje vazebnou afinitu enzymu k DNA, zatímco distální monomer zvyšuje rychlost polymerizace (Lee et al. 2010). Homologem POL γ A je protein Mip1 u *Saccharomyces cerevisiae*, který s lidskou katalytickou podjednotkou polymerázy γ sdílí zhruba 40 % aminokyselinové sekvence, na rozdíl od ní však nevyžaduje přídatnou podjednotku.

Isolovaná katalytická podjednotka polymerázy γ vykazuje nízkou chybovost zhruba 1 nesprávně zařazeného nukleotidu na 500000, přičemž vyřazení exonukleázové aktivity její chybovost zvýší více než dvacetinásobně (Longley et al. 2001), což platí i u myších modelů (Williams et al. 2010), kde byl navíc zjištěn devadesáti násobný nárůst množství delecí (Vermulst et al. 2008) a také byly pozorovány předčasné projevy stárnutí u myši homozygotních pro rekombinantní polymerázu. Přesnost replikace však sníží i přítomnost přídatné podjednotky POL γ B (Longley et al. 2001). I tak však polymeráza γ zřejmě způsobuje více než 85 % substitučních mutací mtDNA, jak vyplývá ze srovnání počtu mutací v DNA replikované POLG *in vitro* oproti jejich množství zjištěnému *in vivo* (Zheng et al. 2006). Je tak pravděpodobně zodpovědná i za většinu mutací, které se v mitochondriálním genomu akumulují v průběhu stárnutí organismu (Cortopassi et al. 1992; Michikawa et al. 1999). V současné době je známo zhruba 300 různých patogenních mutací v genu katalytické podjednotky polymerázy γ , *POLG* (<https://tools.niehs.nih.gov/polg/>) (Young & Copeland 2016) které způsobují nejméně 6 různých definovaných syndromů: Alpersův-Huttenlocherův syndrom (AHS), spektrum dětské myocerebrohepatopatie (myocerebrohepatopathy spectrum, MCHS), syndrom myoklonické epilepsie, myopatie a sensorické ataxie (myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia, MEMSA), spektrum ataxie a neuropatie (ataxia neuropathy spectrum, ANS), autosomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie (adPEO) a autosomálně recesivní PEO (arPEO) (Cohen et al. 1993). Z nich pro

minimálně poslední tři uvedené jsou charakteristické delece mtDNA (viz níže). Také změny desetinásobné repetice trinukleotidu CAG v druhém exonu *POLG* (poblíž N konce budoucího proteinu) byly dávány do souvislosti s poruchami jako mužská neplodnost (Jensen et al. 2004) (pozdější studie však tuto souvislost nepotvrdily (Aknin-Seifer et al. 2005)), rakovina varlat nebo Parkinsonova choroba (Saneto & Naviaux 2010).

Progresivní externí oftalmoplegie je mitochondriální porucha typicky spojená s akumulací delecí a bodových mutací mtDNA, klinicky charakterizovaná pozdním nástupem (mezi 18 a 40 lety věku), oboustrannou ptózou, progresivním slábnutím vnějších svalů oka (oftalmoparéza), proximální svalovou slabostí a intolerancí cvičení (Suomalainen et al. 1997). Může být doprovázena šedým zákalem, hypogonadismem, dysfagií, poruchami sluchu nebo depresí (Servidei et al. 1991; Suomalainen et al. 1997). Kosterní svaly vykazují sníženou aktivitu enzymů dýchacího řetězce a tzv. „ragged red“ vlákna detekovatelná při histologickém vyšetření (Cohen et al. 1993). Výskyt delecí u pacientů s PEO byl poprvé prokázán v roce 1989 (Zeviani et al. 1989), první mutace *POLG* způsobující PEO byly identifikovány v roce 2001 (Van Goethem et al. 2001). Všechny známé mutace *POLG* způsobující adPEO jsou kromě jediné výjimky umístěny v konzervované oblasti polymerázové domény POL γ A (Graziewicz et al. 2004) (zatímco recesivní PEO mutace bývají na různých místech v genu). Tři z těchto mutací, substituce p.His932Tyr, p.Arg943His a p.Tyr955Cys způsobí změnu postranních řetězců, které jsou v přímém kontaktu s přichozím dNTP (Graziewicz et al. 2004; Stumpf et al. 2010), což zapříčiní snížení polymerázové aktivity na méně než 1 % oproti „wild-type“ enzymu a významný pokles procesivity (Graziewicz et al. 2004). Substituce p.Tyr955Cys navíc způsobí deseti až stonásobné snížení přesnosti replikace a nárůst nukleotidových záměn (Ponamarev et al. 2002). Mutace *POLG* způsobující adPEO mohou souviset i se vznikem Parkinsonovi choroby nebo předčasnou menopauzou žen (Luoma et al. 2004).

Většina patogenních mutací *POLG* bývá asociována s arPEO a tito pacienti bývají složenými heterozygoty, tyto mutace se tedy objevují spolu s jinou patogenní mutací způsobující PEO. Příkladem je substituce p.Ala467Thr, nejčastější patogenní mutace *POLG* (Tang et al. 2011), vyskytující se např. u 0,6 % belgické populace (Van Goethem et al. 2003). Ala⁴⁶⁷ se nachází v hydrofobní oblasti domény interagující s podjednotkou POL γ B a substituce za threonin pravděpodobně tuto hydrofobicitu narušuje (Euro et al. 2011). Mutantní enzym disponuje zhruba 4% polymerázovou aktivitou oproti „wild-type“ proteinu, má sníženou procesivitu a schopnost vazby templátu (Chan et al. 2005). V souladu s tím byla pozorována porucha interakce s podjednotkou POL γ B (Chan et al. 2005). Tato mutace byla nalezena u složených heterozygotů trpících arPEO, ataxia-neuropatie a Alpersovým syndromem (Van Goethem et al. 2003; Naviaux & Nguyen 2005) a také v homozygotní podobě způsobující závažnou ataxii projevující se v dospívání (Van Goethem et al. 2004). Alpersův syndrom je mitochondriální onemocnění postihující především děti. Projevuje se progresivní mozkovou degenerací způsobující demenci, hluchotu, kortikální slepotu a záchvaty, následovanou selháním jater a smrtí. Pacienti se zřídka dožívají více než deseti let věku. Biopsie kosterní svaloviny jednoho

pacienta ukázala snížený obsah mtDNA na zhruba 30 % oproti normálu a sníženou aktivitu polymerázy γ a ETC (Naviaux et al. 1999). Je známo již více než 100 různých mutací *POLG* spojených s tímto syndromem, všechny jsou recesivní (<https://tools.niehs.nih.gov/polg/>) (Tang et al. 2011). Ataxie-neuropatie, také zvaná MIRAS (mitochondrial-associated ataxia syndrome) (Hakonen et al. 2005), SCAE (spino-cerebellar ataxia-epilepsy syndrome) nebo SANDO (sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia) (Van Goethem et al. 2004) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu *POLG* projevující se delecemi mtDNA, periferní neuropatií, dysartrií, mimovolnými pohyby, myoklonem a epileptickými záchvaty. Alpersův syndrom byl identifikován u pacientů s kombinací mutací p.Ala467Thr a p.Glu873stop (Naviaux & Nguyen 2005), zatímco ataxie se vyskytla u pacientů s kombinací mutací p.Ala467Thr s p.Arg3Pro, p.Leu304Arg nebo p.Arg627Trp (Van Goethem et al. 2003) a dále pak u pacientů se substitucí p.Ala467Thr v jedné alele a substitucemi p.Arg627Gln a p.Gln1236His nebo p.Trp748Ser a p.Glu1143Gly ve druhé (Luoma et al. 2005). Substitute p.Trp748Ser je zároveň druhou nejčastější patogenní mutací *POLG* (Tang et al. 2011) vyskytující se s frekvencí 1:125 ve finské populaci a v kombinaci s mutací p.Glu1143Gly je častou příčinou ataxie (Hakonen et al. 2005). Způsobuje snížení katalytické aktivity polymerázy γ a její schopnosti vázat substrát, tento efekt je však překvapivě částečně potlačen právě mutací p.Glu1143Gly (Chan et al. 2005).

První popsanou patogenní mutací *POL γ B* byla substitute p.Gly451Glu způsobující neschopnost dimeru *POL γ B* vázat podjednotku *POL γ A* a to i v případě heterodimeru jedné mutované a jedné původní varianty monomeru *POL γ B* (Young et al. 2011). Pacient trpěl progresivní externí oftalmoplegií s delecemi mtDNA a ptózou. Druhá objevená mutace, projevující se jako adPEO s pozdním nástupem, byla způsobená insercí c.1207-1208ins24 vedoucí k chybnému sestřihu a tím absenci exonu 7 v C terminální doméně proteinu (Walter et al. 2010). V roce 2011 byla provedena studie posuzující 7 dalších mutantních variant *POL γ B* nalezených u pacientů z hlediska jejich schopnosti stimulace funkce katalytické podjednotky, její vazby a schopnosti dimerizace a to jak ve formě homodimeru, tak heterodimeru s wild-type proteinem. Některé z těchto variant vykazovaly normální chování, jiné sníženou funkci a některé neschopnost vazby podjednotky *POL γ A* (Young et al. 2011).

3.3.2 Helikáza Twinkle

Twinkle je mitochondriální replikativní helicáza vykazující významnou homologii k T7 gp4 primáze polymeráze. S tou sdílí 46% podobnost a 15% totožnost aminokyselinové sekvence (Spelbrink et al. 2001). Twinkle je kódován genem *PEOI* na chromosomu 10 (také *C10orf2*) a patří do superrodiny primáz/helikáz č. 4 (superfamily 4, SF4), kam kromě T7 gp4 patří také replikativní helicáza DnaB a rekombináza RecA *E. coli* (Patel & Picha 2000). Twinkle obsahuje C-terminální doménu s helicázovou funkcí a N-terminální doménu podobnou primázové doméně (Ziebarth et al. 2007) propojené krátkou spojovací oblastí. C-terminální doména obsahuje pět konzervovaných helicázových

motivů a vykazuje 56% aminokyselinovou podobnost s T7 gp4 proteinem (Spelbrink et al. 2001), zatímco N-terminální doména postrádá některé důležité aminokyseliny a Twinkle tak nemá primázovou aktivitu *in vitro*, tato doména je však stále potřebná pro helikázovou aktivitu a vazbu templátu (Farge et al. 2008). Absence primázového motivu Twinkle je však druhotný stav zvířecího proteinu a například homolog u *Arabidopsis thaliana* primázovou aktivitu vykazuje (Diray-Arce et al. 2013; Shutt & Gray 2006b). Na vyšší úrovni organizace tvoří Twinkle do kruhu uspořádané hexamery a heptamery, pro jejichž vznik je nejdůležitější spojovací oblast mezi N- a C-terminální doménou monomeru (Fernandez-Millan et al. 2015; Lee & Richardson 2004). Twinkle denaturuje dsDNA za přítomnosti NTP ve směru 5'→3' (tato aktivita je stimulována přítomností mtSSB proteinu) (Korhonen et al. 2003) a je schopen zprostředkovat i následnou renaturaci dvou komplementárních řetězců ssDNA (Sen et al. 2012).

Bylo identifikováno více než 30 mutací *PEOI* způsobujících lidská mitochondriální onemocnění. Gen *PEOI* byl původně objeven jako lokus způsobující progresivní externí oftalmoplegii v roce 2001 (Spelbrink et al. 2001). Všechny známé patogenní dominantně dědičné mutace *PEOI* způsobují adPEO, doprovázenou u některých pacientů kardiomyopatií, lehkou ataxií, parkinsonismem nebo depresí (Van Hove et al. 2009; Suomalainen et al. 1997). Většina pacientů je pro mutace *PEOI* způsobující adPEO heterozygotní (Van Hove et al. 2009), existují však i případy homozygotů s dřívějšími a vážnějšími projevy onemocnění (Spelbrink et al. 2001). Velká část těchto mutací se nalézá ve spojovací oblasti, kde pravděpodobně narušují multimerizaci proteinu (Lee & Richardson 2004), což bylo prokázáno například v případě mutací p.Arg374Gln a p.Ile367Thr. Rekombinantní proteiny s těmito záměnami nebyly schopny multimerizace a byly tudíž *in vitro* inaktivní (Korhonen et al. 2008), při expresi v buněčných liniích však stále tvořily multimery v důsledku přítomnosti nemutované varianty Twinkle (Goffart et al. 2009). Některé mutantní varianty jsou schopny multimerizace *in vitro*, jako například substituce p.Ser369Pro nebo p.Leu381Pro, narušují však pravděpodobně ATPázovou aktivitu proteinu a při expresi v buněčných liniích způsobují zastavení postupu replikace a pokles obsahu mtDNA (Goffart et al. 2009; Korhonen et al. 2008). Jedinou mutací způsobující adPEO pozorovanou v homozygotním stavu u pacientů je substituce p.Ala359Thr, ta má však v heterozygotní podobě poměrně mírné projevy, což je v souladu s teorií tvrdící, že většina těchto mutací je v homozygotní podobě embryonálně letální (Spelbrink et al. 2001).

Další patogenní mutace *PEOI* způsobující adPEO se nacházejí v C-terminální doméně, kde mohou způsobovat poruchy hexamerizace, jako např. substituce p.Ala475Pro, nacházející se v blízkosti aminokyselin p.Arg374 a p.Phe370 spojovací oblasti (Korhonen et al. 2008). Substituce p.Trp474Cys nezabraňuje hexamerizaci, snižuje však helikázovou aktivitu o 70 % a zdá se, že specificky narušuje iniciaci replikace (Goffart et al. 2009). Mutace v N-terminální doméně obvykle nenarušují hexamerizaci proteinu (kromě p.Lys319Glu), ale způsobují poruchy funkce helikázy v důsledku snížení ATPázové a ssDNA vazebné aktivity (Goffart et al. 2009) a kromě p.Arg334Gln nejsou tyto

mutantní varianty v kombinaci s polymerázou γ schopny *in vitro* zprostředkovat replikaci mtDNA (Holmlund et al. 2009).

Existují i autosomálně recesivní patogenní mutace *PEO1*, jako například p.Tyr508Cys způsobující spinocerebelární ataxii s nástupem v dětském věku (infantile onset spinocerebellar ataxia, IOSCA), u níž se nevyskytují delece ale orgánově specifický pokles obsahu mtDNA v mozku a játrech (Hakonen et al. 2008). Podobný lokalizovaný pokles obsahu mtDNA byl pozorován i v případě pacientů s homozygotní substitucí p.Thr457Ile, kdy *in vitro* analýza ukázala pokles helikázové aktivity zhruba na polovinu (Sarzi et al. 2007).

V roce 2005 byl vytvořen transgenní myší model adPEO s duplikací 13 aminokyselin (353–365) ve spojovací oblasti, u něhož byly nalezeny vícenásobné delece mtDNA a zastavení replikace (Goffart et al. 2009; Tyynismaa et al. 2005).

3.3.3 *mtSSB*

Lidský mitochondriální protein vázající jednořetězcovou DNA sdílí homologii s SSB proteinem *E. coli* (Curth et al. 1994) a v mitochondriích funguje ve formě tetrameru (Yang et al. 1997). Delece genu *MIP1* (kodujícího mtSSB kvasinky) vede k úplné ztrátě mtDNA (Van Dyck et al. 1992), podobně RNAi mtSSB u octomilky (*Drosophila melanogaster*) způsobí výrazný pokles obsahu mtDNA (Farr et al. 2004). MtSSB podporuje funkci polymerázy γ a Twinkle (Genuario & Wong 1993; Korhonen et al. 2003) a eliminuje zastavení replikace v homopolymerních úsecích mtDNA (Mikhailov & Bogenhagen 1996), zatím však nebyla objevena žádná patologická mutace v genu kódujícím tento protein.

3.3.4 *DNA2*

DNA2 je protein o hmotnosti zhruba 120 kDa mající nukleázovou, ATPázovou a helikázovou doménu (Masuda-Sasa, Imamura, et al. 2006) a na rozdíl od kvasinkového proteinu γ Dna2 neobsahuje jadernou lokalizační sekvenci (nuclear localization sequence, NLS) (Bae & Seo 2000; Masuda-Sasa, Imamura, et al. 2006). *In vitro* vykazuje ATPázovou, ssDNA endonukleázovou, 5'→3' helikázovou aktivitu (Masuda-Sasa, Imamura, et al. 2006) a renaturační aktivitu (Masuda-Sasa, Polaczek, et al. 2006). Vzhledem k absenci NLS lidské DNA2 není překvapivé, že původní výzkumy ukázali její výhradně mitochondriální lokalizaci (Zheng et al. 2008), později byl však tento závěr rozporován a zdá se, že hDNA2 má jak mitochondriální, tak jadernou lokalizaci a plní důležitou funkci v replikaci a opravách jak mitochondriálního, tak jaderného genomu (Duxin et al. 2009).

Byly objeveny minimálně tři heterozygotní substituční mutace u pacientů s mitochondriálním onemocněním, projevující se delecemi mtDNA, ptózou a progersivní myopatií. Substituce p.Arg284 a p.Lys313Glu se nachází v nukleázové doméně proteinu a pravděpodobně jsou v kontaktu s řetězcem ssDNA, *in vitro* pak vykazují sníženou nukleázovou, helikázovou i ATPázovou aktivitu. Substituce p.Val723Ile je umístěna na rozhraní ATPázové a helikázové domény a mutantní protein *in vitro* vykazuje sníženou nukleázovou, zvýšenou helikázovou a nezměněnou ATPázovou aktivitu (Ronchi et al. 2013).

3.3.5 PIF1

Lidská helikáza PIF1 je zhruba 70 kDa vážící protein z konzervované rodiny helikáz vyskytujících se u eukaryot od kvasinek po savce (Bochman et al. 2010). S kvasinkovou PIF1 helikázou sdílí 24 % aminokyselinové sekvence, s myší pak 84 % (Mateyak & Zakian 2006). Na N-konci obsahuje NLS a na C-konci mitochondriální lokalizační sekvenci, vyskytuje se však ve dvou sestřihových variantách. Varianta dlouhá 707 aminokyselin se vyskytuje především v mitochondriích, zatímco 641 aminokyselin dlouhá varianta zkrácená na C-konci je lokalizována do jádra (Futami et al. 2007). hPIF1 je produkována v závislosti na buněčném cyklu především G2/M fázi (Mateyak & Zakian 2006) a zdá se, že má na ATP závislou 5'→3' helikázovou aktivitu a inhibuje funkci telomerázy (Gu et al. 2008; Zhang et al. 2006). Byl vytvořen myší model s vyřazeným genem *mPif1* (homologním lidskému k *PIF1*) v obou kopiích. Tyto myši však nevykazují žádné abnormality, mají normální délku života a nemají zvýšenou citlivost k mutagenům (Snow et al. 2007).

Mutace lidského proteinu PIF1 není spojena se známou mitochondriální poruchou, substituce p.Leu319Pro byla však nalezena u rizikových osob z hlediska predispozice ke vzniku rakoviny prsu (Chisholm et al. 2012).

3.3.6 RNáza H1

Ribonukleáza H1, neboli RNáza H1, je protein kódovaný genem *RNASEH1* štěpící ribonukleotidové řetězce v hybridních RNA-DNA dvouřetězcových molekulách obsahujících alespoň 4 ribonukleotidy za sebou (Cerritelli & Crouch 2009). Má dvě varianty translace závislé na použití jednoho ze dvou kodonů pro metionin na 5'-konci mRNA, přičemž translací od prvního z nich vznikne protein obsahující mitochondriální lokalizační signál, zatímco protein vzniklý translací od druhého kodonu pro metionin je lokalizován do jádra (Cerritelli et al. 2003; Cerritelli & Crouch 2009). Bylo zaznamenáno minimálně šest případů recesivních substitučních mutací v genu *RNASEH1* způsobujících mitochondriální onemocnění u lidí, ve dvou případech se jednalo o složené heterozygoty a čtyři zbývající pacienti z jedné rodiny měli stejnou homozygotní mutaci. Všechny zmíněné mutace se nacházely v katalytické doméně proteinu a mutované proteiny měly in vitro sníženou endoribonukleázovou aktivitu. Všichni pacienti trpěli chronickou PEO po dvacátém roce života a postupně se u nich rozvinula svalová slabost, dysfagie, poruchy koordinace chůze, dysmetrie (porucha prostorové orientace, odhadu a cílených pohybů) a dysartrie. Svalové biopsie navíc ukázaly poruchu funkce komplexů dýchacího řetězce a tzv. „ragged-red“ vlákna, přičemž všechny výše uvedené symptomy se shodují s hypotézou, že mutace *RNASEH1* se projevují pouze na úrovni mitochondrií, protože zde, na rozdíl od jádra, nemůže být zastoupena jaderně lokalizovanou RNázou H2 (Reyes et al. 2015).

3.3.7 POLRMT

Mitochondriální RNA polymeráza je protein zajišťující transkripci mitochondriálního genomu a vykazující homologii k gp1 RNA polymeráze bakteriofága T7 (Tiranti et al. 1997). Transkripce

mitochondriální DNA probíhá ze dvou promotorů umístěných v NCR zvaných LSP (light strand promoter, promotor lehkého řetězce) a HSP (heavy strand promoter, promotor těžkého řetězce) a produkuje polycistronní transkripty, přičemž většina genů je umístěna na těžkém řetězci a lehký řetězec obsahuje pouze gen *MT-ND6* podjednotky ETC komplexu I a několik genů transferových RNA (Asin-Cayuela & Gustafsson 2007). Na rozdíl od T7 gp1 není POLRMT schopná zahájit sama transkripci a vyžaduje přítomnost transkripčních faktorů TFAM a TFB2M (mitochondriální transkripční faktor B2) (Falkenberg et al. 2002; Fuchs & Fuchs 1971). POLRMT navíc však také slouží jako mitochondriální replikativní primáza syntetizující primery potřebné pro zahájení replikace obou řetězců mtDNA (Chang & Clayton 1985; Wanrooij et al. 2008). Oproti T7 gp1 má na svém N konci přidanou sekvenci neznámé funkce, jejíž delece v genu *S. cerevisiae* (*RPO41*) významně neovlivní transkripci, ale způsobí ztrátu mtDNA (Wang & Shadel 1999). Replikaci těžkého řetězce předchází syntéza zhruba 100 nt dlouhého RNA primeru v místě LSP pomocí POLRMT (Chang & Clayton 1985), místo ukončení primeru a začátku syntézy DNA však zatím není zcela jasně určeno (viz kapitola 3.2). Replikace opoždujícího se řetězce pravděpodobně začíná z jediného místa, ve vzdálenosti zhruba 2/3 délky genomu od začátku replikace vedoucího řetězce (Kang et al. 1997) (viz kapitola 3.2). Tato oblast se v průběhu replikace uspořádává do struktury kličky, přičemž syntéza primeru pomocí POLRMT začíná v oblasti smyčky této struktury a přechod k syntéze DNA nastává o zhruba 25 nukleotidů dál při bázi stopky (Fuste et al. 2010). Zatím nebyla objevena žádná mitochondriální onemocnění způsobená mutací *POLRMT*.

3.3.8 *MGME1*

Zkratka *MGME1* znamená exonukleáza údržby mitochondriálního genomu 1 (mitochondrial genomem maintenance 5'–3' exonuclease 1). Jedná se exonukleázu příbuznou RecB ze superrodiny PD-(D/E)XK kódovanou genem *MGME1* na lokusu 20p11.23, která se pravděpodobně významně podílí na obratu 7S DNA (viz kapitola 3.1) a ztráta funkce tohoto proteinu se projeví hromaděním 7S DNA v kultuře HeLa buněk (Szczesny et al. 2013). Mutace v tomto genu způsobují závažné recesivně dědičné multisystemické mitochondriální onemocnění provázené delecemi a snížením obsahu mtDNA (Kornblum et al. 2013).

4 Nukleotidový metabolismus a vliv jeho proteinů na vznik mtDNA delecí

Z důvodů nastíněných v kapitole 3.3 se poruchy proteinů nukleotidového metabolismu zdají být druhou z nejdůležitějších příčin vzniku delecí, a to především v důsledku jejich vlivu na rovnováhu zásob jednotlivých nukleotidů potřebnou v okolí replikačního aparátu v průběhu replikace (Ashley et al. 2007). Zatímco jaderná DNA je replikována prakticky pouze v S fázi buněčného cyklu, kdy jsou potřebné prekurzory ve formě dNTPs syntetizovány v cytosolu (Reichard 1988), replikace mtDNA probíhá v matrix mitochondrií nezávisle na buněčném cyklu a je navíc od cytosolu oddělena pro dNTPs nepropustnou vnitřní mitochondriální membránou (Birky 2001). Prekurzory dNTPs se proto do mitochondrií dostávají v jiné podobě v dělicích se a klidových buňkách. V dělicích se buňkách jsou přes vnitřní mitochondriální membránu transportovány ve formě dNDPs deoxynukleotidovým přenašečem (DNC, deoxynucleotide carrier) a v matrix jsou následně fosforylovány deoxynukleosiddifosfátkinázami (Dolce et al. 2001; Ferraro et al. 2005). V klidových buňkách jsou prekurzory dNTPs do matrix transportovány ve formě deoxynukleosidů, a to pomocí rovnovážného přenašeče nukleosidů ENT1 (equilibrative nucleoside transporter) (Griffiths et al. 1997). Zde jsou deoxypuriny fosforylovány deoxyguanosinkinázou (DGUOK) a deoxypyrimidiny thymidinkinázou 2 (TK2) (Petrakis et al. 1999).

4.1.1 ANT1

ANT1 (adenine nucleotide translocator 1) je jeden ze tří přenašečů adenosinových nukleotidů na vnitřní mitochondriální membráně vyskytující se především v srdeční a kosterní svalovině (Stepien et al. 1992). Pracuje ve formě homodimeru složeného ze dvou 30kDa podjednotek a jeho funkcí je antiport ADP do matrix výměnou za ATP. Byly identifikovány minimálně čtyři substituční mutace lidského proteinu ANT1 způsobující adPEO (p.Ala114Pro, p.Val289Met, p.Thr293Cys, p.Ala90Asp) (Deschauer et al. 2005; Kaukonen et al. 2000; Napoli et al. 2001) a dále bylo zjištěno, že exprese analogických mutantních proteinů u *S. cerevisiae* způsobuje poruchy buněčné respirace a růstu na nefermentovatelných zdrojích uhlíku (Fontanesi et al. 2004). Identifikován byl také jeden případ recesivní mutace v tomto genu u pacienta s kardiomyopatií, lehkou myopatií kosterní svaloviny a delecemi mtDNA v buňkách kosterní svaloviny (Palmieri et al. 2005).

4.1.2 TK2

Patogenní mutace mitochondriální thymidinkinázy (TK2) se projevují v homozygotním nebo složeném heterozygotním stavu a způsobují syndromy spojené s poklesem obsahu mitochondriální DNA v kosterní svalovině a myopatií, často s nástupem v dětském věku (Carrozzo et al. 2003; Galbiati et al. 2006; Saada et al. 2001). Příkladem jsou homozygotní substituce p.His90Arg a p.Ile181Asp způsobující závažnou myopatii v raném dětství, u těchto pacientů byla ukázána o 14–45% snížená aktivita TK2 ve svalové tkáni (Saada et al. 2001).

4.1.3 DGUOK

Bylo identifikováno minimálně 13 patogenních mutací deoxyguanosinkinázy, většina homozygotních (Freisinger et al. 2006; Salviati et al. 2002). Příkladem jsou substituce p.Arg142Lys, u této varianty proteinu byla zjištěna snížená katalytická aktivita s deoxyguanosinem a žádná aktivita deoxyadenosinem, nebo p.Glu227Lys, zde byla zjištěna vazebná aktivita k substrátu, ale snížená katalytická aktivita (Wang & Eriksson 2003). Často způsobují syndromy spojené s poklesem obsahu mitochondriální DNA, myopatií, ale také např. jaterní selhání (Salviati et al. 2002).

4.1.4 DNC

Deoxynukleotidový přenašeč vnitřní mitochondriální membrány je kodován genem *SLC25A19*. Jeho mutace p.Gly177Ala byla určena jako pravděpodobná příčina vrozené smrtelné mikrocefalie u populace Amišů v Pensylvánii (MCPHA, Amish lethal microcephaly) (Rosenberg et al. 2002). Ta má v této populaci vysokou incidenci 1:500, je provázena α -ketoglutarátovou acidururií a způsobuje obvykle smrt do dvou let věku. Je však možné, že tyto příznaky nejsou způsobeny poruchou transportu deoxynukleotidů, vzhledem k jejich normální koncentraci v mitochondriích myších modelových DNC^{-/-} buněk, a že DNC plní ještě funkci transportu thiaminpyrofosfátu do mitochondrií (Lindhurst et al. 2006).

4.1.5 TP

Thymidinfosforyláza je cytosolický enzym kódovaný genem *ECGF1* katalyzující přeměnu tymidinu na tymin za spotřeby anorganického fosfátu a vzniku deoxyribózy-1-fosfátu. Porucha tohoto enzymu způsobí hromadění tymidinu a uracilu v krvi, což vede k příjmu tymidinu mitochondriemi a stimulaci tvorby deoxytymidintrifosfátu (Spinazzola et al. 2002). Vzniklá nerovnováha prekursorů syntézy mtDNA způsobuje syndromy provázené delecemi mtDNA a snížením jejího množství v mitochondriích (Song et al. 2003). Příkladem je mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie (MNGIE), autosomálně recesivně dědičné onemocnění provázené delecemi mtDNA, poklesem celkového množství mtDNA, ptózou, PEO, gastrointestinální dysmotilitou, kachexií, periferní neuropatií, myopatií a leukoencefalopatií (Hirano et al. 2004). Existuje však několik možností terapie tohoto onemocnění, jako například hemodialýza, dočasně snižující hladinu tymidinu v krvi (Spinazzola et al. 2002), peritoneální dialýza, potlačující některé projevy onemocnění (Ariaudo et al. 2015), enzymová substituční terapie využívající červené krvinky pacienta naplněné rekombinantním TP produkovaným *E. coli* (Bax et al. 2013), transplantace kmenových buněk nebo infuze trombocytů (Hirano et al. 2006; Lara et al. 2006), které u zdravých lidí vykazují vysokou aktivitu thymidinfosforylázy (Shaw et al. 1988). Byl vytvořen myší model deficiencie thymidinfosforylázy, u něhož se projevuje zvýšená hladina dThd a dUrd v krevní plasmě a tkáních a v pokročilejším věku okolo 22 měsíců také roztroušená leukoencefalopatie. Ostatní příznaky MNGIE však u těchto myší nebyly pozorovány (Lopez et al. 2009), využití tohoto modelu je tedy omezené. Byl použit v preklinických studiích genové terapie genu *ECGF1*.

Jednou z možností je AAV (adeno-associated virus) zprostředkovaná genová terapie zacílená na jaterní buňky, která u TP deficientních myší snížila hladinu nukleosidů v játrech, mozku a kosterní svalovině, nikoliv však ve tkáních gastrointestinálního traktu a zároveň vedla ke zvýšení hladiny dGTP v játrech (Torres-Torronteras et al. 2014). Současně je spojena s nebezpečím hepatotoxicity u lidí při použití velkých dávek vektoru (Nathwani et al. 2014).

Další možností je lentivirovým vektorem zprostředkovaná genová terapie s využitím hematopoetických kmenových buněk. Při ní jsou izolovány hematopoetické kmenové buňky pacienta, *ex vivo* transdukovány virovým vektorem a navraceny do těla. Její možnosti byly ukázány na myším modelu, kde došlo k vyrovnání hladiny deoxyribonukleotidů v krvi i při použití nízkých dávek vektoru (Torres-Torronteras et al. 2016).

5 Rozložení delecí v mitochondriálním genomu

V roce 2014 provedli Damas et al. soubornou studii zabývající se poznatky o rozložení delecí a duplikací v mitochondriálním genomu za posledních zhruba 30 let (Damas et al. 2014). V té srovnávají v případě delecí poznatky z 302 odborných publikací, jedné disertační práce a databáze MITOMAP. Zjistili zde několik zajímavých a potenciálně důležitých statistických informací (Obr. 3). Průměrná délka deletovaného úseku je 6 893 nt, přičemž 86,6 % srovnávaných delecí je kratší než 9 000 nt. Zajímavé je i umístění delecí v rámci mitochondriálního genomu, kdy 89 % delecí se nachází celou délkou ve velkém oblouku, zatímco v malém oblouku je to pouze 1,4 % (viz kapitola 3.1). Malý oblouk je v celé své délce zachován u 90,5 % delecí a 93,8 % míst zlomu delecí se nachází v rámci velkého oblouku. Zajímavé je také, že pouze 0,1 % popisovaných delecí, tedy jediný případ, postrádalo počátek replikace těžkého řetězce O_H a 9,5 % počátek replikace lehkého řetězce, kdy 61 z těchto 69 delecí bylo objeveno ve zdravých nebo starých tkáních. Toto pozorování se zdá být v souladu s předpokladem, že mtDNA bez replikačního počátku by neměla možnost se replikovat a přenášet do dceřiných mitochondrií, potažmo buněk, a byla by tudíž výrazně menší šance jejího objevení při vyšetření.

Rozložení míst zlomu delecí v rámci mitochondriálního genomu je nenáhodné, přičemž bylo jednak pozorováno jejich časté umístění poblíž počátků replikace O_H a O_L a zároveň také nenáhodně časté ohraničení těchto míst buď úplnými přímými repeticemi, nebo nedokonalými homologními úseky. Nejdelší pozorovaná přímá repetice v okolí míst zlomu je dlouhá 13 nt, pouze u 4 % delecí jsou však přítomny přesné přímé repetice delší než 10 nt, u 70,3 % jsou přímé repetice kratší než 4 nt a u 13,2 % delecí nejsou přímé repetice přítomny vůbec. I nedokonalé homologie se v okolí 15 nt od míst zlomu nacházely statisticky významně častěji než bychom očekávali při náhodném rozložení bází. Dalším možným vlivem pro vznik přestaveb je častější výskyt jiných než B konformačních variant DNA v okolí míst zlomu (Damas et al. 2012).

6 Závěr

Tato práce popisuje možné příčiny delecí mitochondriální DNA především v oblasti proteinů replikačního aparátu, údržby mtDNA a metabolismu nukleotidů. I přes poměrně velkou pozornost věnovanou v posledních letech mitochondriálním onemocněním, z nichž mnohé se projevují mimo jiné vznikem vícenásobných delecí mtDNA, je o mechanismu a příčinách vzniku těchto delecí známo poměrně málo. Lepší objasnění některých principů by mohlo napomoci především při charakterizaci nově objevených mutací v genech proteinů se známou nebo předpokládanou funkcí při výše zmíněných dějích. V širším měřítku je také nedostatek účinných terapeutických přístupů v případě rozličných mitochondriálních onemocnění včetně těch souvisejících s delecemi. Zde by vysvětlení mechanismu jejich vzniku mohlo ukázat mimo jiné i nové terapeutické možnosti.

7 Použitá literatura

(* sekundární zdroj)

- Acin-Perez R et al. 2004. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* **13**, 805–815.
- Aknin-Seifer IE et al. 2005. Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Hum. Reprod.* **20**, 736–740.
- Althoff T et al. 2011. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *EMBO J.* **30**, 4652–4664.
- Amati-Bonneau P et al. 2008. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotypes. *Brain* **131**, 338–351.
- Andrews RM et al. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147.
- Ariaudo C et al. 2015. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy treated with peritoneal dialysis and bone marrow transplantation. *J. Nephrol.* **28**, 125–127.
- Ashley N et al. 2007. Defects in maintenance of mitochondrial DNA are associated with intramitochondrial nucleotide imbalances. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1400–1411.
- * Asin-Cayuela J, Gustafsson CM. 2007. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 111–117.
- Bae SH, Seo YS. 2000. Characterization of the enzymatic properties of the yeast dna2 Helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* **275**, 38022–38031.
- Ban-Ishihara R et al. 2013. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11863–11868.
- Bax BE et al. 2013. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* **81**, 1269–1271.
- Bayrhuber M et al. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15370–15375.
- * Bebenek K, Kunkel TA. 2004. Functions of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* **69**, 137–165.
- Bender A et al. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* **38**, 515–517.
- Benecke R, Strumper P, Weiss H. 1993. Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson’s disease but normal in Parkinson-plus syndromes. *Brain* **116** (Pt 6, 1451–1463.
- Berry EA, Trumpower BL. 1985. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J. Biol. Chem.* **260**, 2458–2467.
- Bianchi C et al. 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 36562–36569.
- * Birky CWJ. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 125–148.
- Bogenhagen D, Clayton DA. 1978. Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *J. Mol. Biol.* **119**, 49–68.
- * Bogenhagen DF. 2012. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 914–920.
- Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. 2008. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* **283**, 3665–3675.
- * Bochman ML, Sabouri N, Zakian VA. 2010. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 237–249.
- Bowmaker M et al. 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.* **278**, 50961–50969.
- Brandt U. 2011. A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1364–1369.

- Brass EP et al. 2001. Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H603--9.
- * Bratic A, Larsson N-G. 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957.
- Brown TA et al. 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev.* **19**, 2466–2476.
- Brown TA, Clayton DA. 2002. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2004–2010.
- Brown WM, Shine J, Goodman HM. 1978. Human mitochondrial DNA: analysis of 7S DNA from the origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 735–739.
- van Bruggen EF et al. 1966. Circular mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 437–439.
- Carrozzo R et al. 2003. Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion. *Hum. Mutat.* **21**, 453–454.
- Caspari E. 1955. The role of genes and cytoplasmic particles in differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 1026–1037.
- Cerritelli SM et al. 2003. Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol. Cell* **11**, 807–815.
- * Cerritelli SM, Crouch RJ. 2009. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* **276**, 1494–1505.
- Clason T et al. 2010. The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J. Struct. Biol.* **169**, 81–88.
- * Clayton DA. 2003. Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life* **55**, 213–217.
- * Clayton DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693–705.
- Cohen BH, Chinnery PF, Copeland WC. 1993. POLG-Related Disorders. in Pagon RA et al., (Ed.) *GeneReviews*{®}.
- Cortopassi GA et al. 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7370–7374.
- Covian R, Trumpower BL. 2005. Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc1 complex dimer is reduced through center N. *J. Biol. Chem.* **280**, 22732–22740.
- Crews S et al. 1979. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature* **277**, 192–198.
- Cui M et al. 2010. Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1. *J. Biol. Chem.* **285**, 11740–11752.
- Curth U et al. 1994. Single-stranded-DNA-binding proteins from human mitochondria and *Escherichia coli* have analogous physicochemical properties. *Eur. J. Biochem.* **221**, 435–443.
- Damas J et al. 2012. Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7606–7621.
- Damas J et al. 2014. Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease--a comprehensive study. *Hum. Mutat.* **35**, 1–14.
- Davies KM et al. 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 14121–14126.
- Davies KM et al. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13602–13607.
- Delettre C et al. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207–210.
- Deschauer M et al. 2005. A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 311–315.
- Diray-Arce J et al. 2013. The Arabidopsis At1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities. *BMC Plant Biol.* **13**, 36.
- Dolce V et al. 2001. The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2284–2288.
- Dudkina N V et al. 2006. Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* **580**, 3427–3432.
- Dudkina N V et al. 2005. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3225–3229.
- Dudkina N V et al. 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular

- association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* **579**, 5769–5772.
- Duxin JP et al. 2009. Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4274–4282.
- Van Dyck E et al. 1992. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J.* **11**, 3421–3430.
- Ekstrand MI et al. 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 935–944.
- Elliott HR et al. 2008. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260.
- Enns GM et al. 2012. Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 91–102.
- Euro L et al. 2011. Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, Pol gamma. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9072–9084.
- * Faelber K et al. 2013. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **117**, 411–443.
- Falkenberg M et al. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* **31**, 289–294.
- Farge G et al. 2008. The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities. *Nucleic Acids Res.* **36**, 393–403.
- Farr CL et al. 2004. Physiological and biochemical defects in functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and DNA-binding mutants of single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 17047–17053.
- Fernandez-Millan P et al. 2015. The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4284–4295.
- Ferraro P et al. 2005. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J. Biol. Chem.* **280**, 24472–24480.
- Fish J, Raule N, Attardi G. 2004. Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science* **306**, 2098–2101.
- Fisher RP, Clayton DA. 1988. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3496–3509.
- Fontanesi F et al. 2004. Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 923–934.
- Forner F et al. 2006. Quantitative Proteomic Comparison of Rat Mitochondria from Muscle, Heart, and Liver * □. , 608–619.
- Fowler LR, Hatefi Y. 1961. Reconstitution of the electron transport system. III. Reconstitution of DPNH oxidase, succinic oxidase, and DPNH, succinic oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 203–208.
- Fowler LR, Richardson SH. 1963. Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J. Biol. Chem.* **238**, 456–463.
- Freisinger P et al. 2006. Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Arch. Neurol.* **63**, 1129–1134.
- Freyer C et al. 2010. Maintenance of respiratory chain function in mouse hearts with severely impaired mtDNA transcription. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6577–6588.
- Friedman JR et al. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358–362.
- Frohlich C et al. 2013. Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J.* **32**, 1280–1292.
- Fuchs E, Fuchs CM. 1971. In vitro synthesis of T3 AND T7 RNA polymerase at low magnesium concentration. *FEBS Lett.* **19**, 159–162.
- Fung S et al. 2013. The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation. *Mol. Biol. Cell* **24**, 184–193.

- Fuste JM et al. 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol. Cell* **37**, 67–78.
- Futami K, Shimamoto A, Furuichi Y. 2007. Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase. *Biol. {&} Pharm. Bull.* **30**, 1685–1692.
- * Gabaldon T, Huynen MA. 2004. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 212–220.
- Gadir N et al. 2011. Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 1551–1565.
- Galbiati S et al. 2006. New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatr. Neurol.* **34**, 177–185.
- Galkin A, Drose S, Brandt U. 2006. The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1575–1581.
- Genuario R, Wong TW. 1993. Stimulation of DNA polymerase gamma by a mitochondrial single-strand DNA binding protein. *Cell. {&} Mol. Biol. Res.* **39**, 625–634.
- Di Giovanni S et al. 2001. Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* **57**, 515–518.
- Glater EE et al. 2006. Axonal transport of mitochondria requires mlt1 to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J. Cell Biol.* **173**, 545–557.
- Van Goethem G et al. 2001. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.* **28**, 211–212.
- Van Goethem G et al. 2004. POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology* **63**, 1251–1257.
- Van Goethem G et al. 2003. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 133–142.
- Goffart S et al. 2009. Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 328–340.
- Gold VAM et al. 2014. Visualizing active membrane protein complexes by electron cryotomography. *Nat. Commun.* **5**, 4129.
- Gorman GS et al. 2015. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* **77**, 753–759.
- Graziewicz MA et al. 2004. Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat. Struct. {&} Mol. Biol.* **11**, 770–776.
- * Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. 2006. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem. Rev.* **106**, 383–405.
- Griffiths M et al. 1997. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med.* **3**, 89–93.
- Gu Y, Masuda Y, Kamiya K. 2008. Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6295–6308.
- Guenebaut V et al. 1998. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105–112.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 331–368.
- Hakonen AH et al. 2008. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3822–3835.
- Hakonen AH et al. 2005. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 430–441.
- Hallberg RL. 1974. Mitochondrial DNA in *Xenopus laevis* oocytes. I. Displacement loop occurrence. *Dev. Biol.* **38**, 346–355.
- Harner M et al. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* **30**, 4356–4370.

- * Hatefi Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015–1069.
- Hatefi Y, Rieske JS. 1967. The preparation and properties of DPNH—cytochrome c reductase (complex I–III of the respiratory chain). in *Methods in enzymology*. pp. 225–231.
- Head B et al. 2009. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **187**, 959–966.
- Heinemeyer J et al. 2007. A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 12240–12248.
- * Hensen F et al. 2014. To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie* **100**, 219–226.
- Hirano M et al. 2006. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* **67**, 1458–1460.
- Hirano M et al. 2004. Thymidine phosphorylase deficiency causes MNGIE: an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **23**, 1217–1225.
- Holmlund T et al. 2009. Structure-function defects of the twinkle amino-terminal region in progressive external ophthalmoplegia. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 132–139.
- * Holt IJ. 2009. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 358–365.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**, 717–719.
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515–524.
- * Holt IJ, Reyes A. 2012. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**.
- Van Hove JLK et al. 2009. Finding twinkle in the eyes of a 71-year-old lady: a case report and review of the genotypic and phenotypic spectrum of TWINKLE-related dominant disease. *Am. J. Med. Genet. A* **149A**, 861–867.
- Hunte C et al. 2000. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**, 669–684.
- Chan SSL, Longley MJ, Copeland WC. 2005. The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit. *J. Biol. Chem.* **280**, 31341–31346.
- Chance B, Williams GR. 1955. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* **176**, 250–254.
- * Chandel NS. 2014. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* **12**, 34.
- Chang DD, Clayton DA. 1985. Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 351–355.
- Chen H et al. 2010. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* **141**, 280–289.
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC. 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**, 548–562.
- Chen Y, Liu Y, Dorn GW 2nd. 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ. Res.* **109**, 1327–1331.
- * Chinnery PF. 2015. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol. Med.* **7**, 1503–1512.
- Chisholm KM et al. 2012. A genomewide screen for suppressors of Alu-mediated rearrangements reveals a role for PIF1. *PLoS One* **7**, e30748.
- * Christian BE, Spremulli LL. 2012. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 1035–1054.
- Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. 2004. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* **2**, 9.
- Ingerman E et al. 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. **170**, 1021–1027.
- Ishihara N et al. 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and

- synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* **11**, 958–966.
- Iwasaki T, Matsuura K, Oshima T. 1995. Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **270**, 30881–30892.
- Jensen M et al. 2004. Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermograms and unexplained subfertility. *Hum. Reprod.* **19**, 65–70.
- Kang D et al. 1997. In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 15275–15279.
- Kasiviswanathan R, Copeland WC. 2011. Ribonucleotide discrimination and reverse transcription by the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **286**, 31490–31500.
- Kaufman BA et al. 2007. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3225–3236.
- Kaukonen J et al. 2000. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* **289**, 782–785.
- Kearns TP, Sayre GP. 1958. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA. Arch. Ophthalmol.* **60**, 280–289.
- * Khan SA. 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 442–455.
- Khrapko K et al. 1999. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2434–2441.
- Kirschner RH, Wolstenholme DR, Gross NJ. 1968. Replicating molecules of circular mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **60**, 1466–1472.
- Klingbeil MM, Motyka SA, Englund PT. 2002. Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell* **10**, 175–186.
- Koga Y et al. 2007. MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion* **7**, 133–139.
- Korhonen JA et al. 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* **23**, 2423–2429.
- Korhonen JA et al. 2008. Structure-function defects of the TWINKLE linker region in progressive external ophthalmoplegia. *J. Mol. Biol.* **377**, 691–705.
- Korhonen JA, Gaspari M, Falkenberg M. 2003. TWINKLE Has 5' → 3' DNA Helicase Activity and Is Specifically Stimulated by Mitochondrial Single-stranded DNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 48627–48632.
- Kornblum C et al. 2013. Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat. Genet.* **45**, 214–219.
- Krasilnikov AS et al. 1997. Mechanisms of triplex-caused polymerization arrest. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1339–1346.
- Krause F et al. 2005. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 583–590.
- Krause F, Reifschneider NH, et al. 2004. “Respirasome”-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J. Biol. Chem.* **279**, 48369–48375.
- Krause F, Scheckhuber CQ, et al. 2004. Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26453–26461.
- Krebs HA, Johnson WA. 1937. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem. J.* **31**, 645–660.
- * Kuhlbrandt W. 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* **13**, 89.
- Kukat C et al. 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539.
- * Lackner LL. 2014. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol.* **12**, 35.

- Lara MC et al. 2006. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* **67**, 1461–1463.
- Larsson NG et al. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* **18**, 231–236.
- Lecrenier N, Van Der Bruggen P, Foury F. 1997. Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene* **185**, 147–152.
- Lee S-J, Richardson CC. 2004. The linker region between the helicase and primase domains of the gene 4 protein of bacteriophage T7. Role in helicase conformation and activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 23384–23393.
- Lee Y-S et al. 2010. Each monomer of the dimeric accessory protein for human mitochondrial DNA polymerase has a distinct role in conferring processivity. *J. Biol. Chem.* **285**, 1490–1499.
- Lee Y-S, Kennedy WD, Yin YW. 2009. Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell* **139**, 312–324.
- Legros F et al. 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* **117**, 2653–2662.
- Li P et al. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489.
- Lindhurst MJ et al. 2006. Knockout of Slc25a19 causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15927–15932.
- Longley MJ et al. 2001. The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 38555–38562.
- Lopez LC et al. 2009. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 714–722.
- Low HH et al. 2009. Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. *Cell* **139**, 1342–1352.
- Luoma P et al. 2004. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet (London, England)* **364**, 875–882.
- Luoma PT et al. 2005. Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1907–1920.
- * MacKenzie JA, Payne RM. 2007. Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 509–523.
- Maniura-Weber K et al. 2004. Transient overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6015–6027.
- * Mannella CA. 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 542–548.
- Masuda-Sasa T, Imamura O, Campbell JL. 2006. Biochemical analysis of human Dna2. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1865–1875.
- Masuda-Sasa T, Polaczek P, Campbell JL. 2006. Single strand annealing and ATP-independent strand exchange activities of yeast and human DNA2: possible role in Okazaki fragment maturation. *J. Biol. Chem.* **281**, 38555–38564.
- Mateyak MK, Zakian VA. 2006. Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase. *Cell Cycle* **5**, 2796–2804.
- Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. 2010. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18410–18415.
- McKenzie M et al. 2006. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* **361**, 462–469.
- McLean JR et al. 1958. Incorporation of labeled amino acids into the protein of muscle and liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **233**, 657–663.
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**, 1747–1752.

- Meier T et al. 2005. Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* **308**, 659–662.
- Michel B, Ehrlich SD, Uzzell M. 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* **16**, 430–438.
- Michikawa Y et al. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* **286**, 774–779.
- Mikhailov VS, Bogenhagen DF. 1996. Termination within oligo(dT) tracts in template DNA by DNA polymerase gamma occurs with formation of a DNA triplex structure and is relieved by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 30774–30780.
- Milone M et al. 2009. Mitochondrial disorder with OPA1 mutation lacking optic atrophy. *Mitochondrion* **9**, 279–281.
- Miralles Fuste J et al. 2014. In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication. *PLoS Genet.* **10**, e1004832.
- Misko A, Jiang S. 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J. Neurosci.*
- Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148.
- * Mitchell P. 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1507–1538.
- Moraes CT et al. 1989. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1293–1299.
- Morris AA et al. 1996. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann. Neurol.* **40**, 25–30.
- Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* **151**, 367–380.
- Nakase H et al. 1990. Transcription and translation of deleted mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: implications for pathogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **46**, 418–427.
- Napoli L et al. 2001. A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family. *Neurology* **57**, 2295–2298.
- Nass MM. 1980. Pulse-label analysis and mapping of the two terminal regions of asynchronous complementary strand replication of mitochondrial DNA in transformed hamster cells. *J. Mol. Biol.* **140**, 257–281.
- Nass MM, Nass S. 1963. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND ELECTRON STAINING REACTIONS. *J. Cell Biol.* **19**, 593–611.
- Nass S, Nass MM, Hennix U. 1965. DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN ISOLATED RAT-LIVER MITOCHONDRIA. *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 426–435.
- Nathwani AC et al. 2014. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994–2004.
- Naviaux RK et al. 1999. Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann. Neurol.* **45**, 54–58.
- Naviaux RK, Nguyen K V. 2005. POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* **58**, 491.
- Newton KJ, Coe EH. 1986. Mitochondrial DNA changes in abnormal growth (nonchromosomal stripe) mutants of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7363–7366.
- Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC. 2011. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **18**, 1290–1296.
- * Nicholls TJ, Minczuk M. 2014. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp. Gerontol.* **56**, 175–181.
- Noji H et al. 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* **386**, 299–302.
- * Nunnari J, Suomalainen A. 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159.
- Otera H et al. 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **191**, 1141–1158.
- Palmieri L et al. 2005. Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.*

- 14**, 3079–3088.
- Parone PA et al. 2008. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* **3**, e3257.
- * Patel SS, Picha KM. 2000. Structure and function of hexameric helicases. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 651–697.
- Paumard P et al. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221–230.
- Pearson HA et al. 1979. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J. Pediatr.* **95**, 976–984.
- Perkins GA, Frey TG. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* **31**, 97–111.
- Petrakis TG et al. 1999. Cloning and characterization of mouse deoxyguanosine kinase. Evidence for a cytoplasmic isoform. *J. Biol. Chem.* **274**, 24726–24730.
- Pfeiffer K et al. 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 52873–52880.
- Pham XH et al. 2006. Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 24647–24652.
- Pohjoismaki JLO et al. 2010. Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *J. Mol. Biol.* **397**, 1144–1155.
- * Pomerantz RT, O'Donnell M. 2010. What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* **9**, 2537–2543.
- Ponamarev M V et al. 2002. Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 15225–15228.
- Rambold AS et al. 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10190–10195.
- Al Rawi S et al. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**, 1144–1147.
- Reifschneider NH et al. 2006. Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *J. Proteome Res.* **5**, 1117–1132.
- * Reichard P. 1988. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 349–374.
- Reyes A et al. 2009. Analysis of mitochondrial DNA by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **554**, 15–35.
- Reyes A et al. 2005. Bidirectional replication initiates at sites throughout the mitochondrial genome of birds. *J. Biol. Chem.* **280**, 3242–3250.
- Reyes A et al. 2015. RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **97**, 186–193.
- * Rizzuto R et al. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 566–578.
- Robberson DL, Kasamatsu H, Vinograd J. 1972. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 737–741.
- Rodriguez MC et al. 2007. Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle and Nerve* **35**, 235–242.
- Rolland SG et al. 2013. Impaired complex IV activity in response to loss of LRPPRC function can be compensated by mitochondrial hyperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2967–76.
- Ronchi D et al. 2013. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 293–300.
- Ropp PA, Copeland WC. 1996. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* **36**, 449–458.
- Rosenberg MJ et al. 2002. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat. Genet.* **32**, 175–179.
- Rotig A et al. 1989. Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet (London, England)* **1**, 902–903.

- Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. 2003. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* **22**, 6182–6192.
- Saada A et al. 2001. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.* **29**, 342–344.
- Sagan L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**, 255–274.
- Salviati L et al. 2002. Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations. *Ann. Neurol.* **52**, 311–317.
- * Saneto RP, Naviaux RK. 2010. Polymerase gamma disease through the ages. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **16**, 163–174.
- Santos JH, Mandavilli BS, Van Houten B. 2002. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. *Methods Mol. Biol.* **197**, 159–176.
- Sarzi E et al. 2007. Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* **62**, 579–587.
- Seligmann H. 2010. Mitochondrial tRNAs as light strand replication origins: similarity between anticodon loops and the loop of the light strand replication origin predicts initiation of DNA replication. *Biosystems.* **99**, 85–93.
- Seligmann H, Krishnan NM, Rao BJ. 2006. Possible multiple origins of replication in primate mitochondria: Alternative role of tRNA sequences. *J. Theor. Biol.* **241**, 321–332.
- Sen D et al. 2012. Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase. *J. Biol. Chem.* **287**, 14545–14556.
- Servidei S et al. 1991. Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphologic, and biochemical studies. *Neurology* **41**, 1053–1059.
- Shaw T et al. 1988. The role of blood platelets in nucleoside metabolism: regulation of platelet thymidine phosphorylase. *Mutat. Res.* **200**, 117–131.
- Shi Y et al. 2012. Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16510–16515.
- Shutt TE, Bestwick M, Shadel GS. 2011. The core human mitochondrial transcription initiation complex: It only takes two to tango. *Transcription* **2**, 55–59.
- * Shutt TE, Gray MW. 2006a. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet.* **22**, 90–95.
- Shutt TE, Gray MW. 2006b. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **62**, 588–599.
- Schafer E et al. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **281**, 15370–15375.
- Schafer E et al. 2007. Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **46**, 12579–12585.
- Schagger H et al. 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**, 36349–36353.
- Schagger H, Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783.
- Schatz G. 1963. THE ISOLATION OF POSSIBLE MITOCHONDRIAL PRECURSOR STRUCTURES FROM AEROBICALLY GROWN BAKER'S YEAST. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 448–451.
- Scheckhuber CQ et al. 2007. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* **9**, 99–105.
- Schmidt O et al. 2011. Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell*, 227–239.
- * Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 655–667.
- Simsek D et al. 2011. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* **471**, 245–248.
- Sjostrand FS. 1953. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* **171**, 30–32.
- Snow BE et al. 2007. Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in

- vivo. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1017–1026.
- Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. 2003. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 43893–43896.
- Song W et al. 2011. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* **17**, 377–382.
- Spelbrink JN et al. 2001. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* **28**, 223–231.
- Spinazzola A et al. 2002. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 4128–4133.
- Srivastava S, Moraes CT. 2005. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 893–902.
- Stepien G et al. 1992. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **267**, 14592–14597.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700–1705.
- van Straaten HLM et al. 2005. Neonatal lactic acidosis, complex I/IV deficiency, and fetal cerebral disruption. *Neuropediatrics* **36**, 193–199.
- Stroh A et al. 2004. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 5000–5007.
- Stumpf JD et al. 2010. mip1 containing mutations associated with mitochondrial disease causes mutagenesis and depletion of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2123–2133.
- Suomalainen A et al. 1997. Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* **48**, 1244–1253.
- Svensson-Ek M et al. 2002. The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Mol. Biol.* **321**, 329–339.
- Szczesny RJ et al. 2013. Identification of a novel human mitochondrial endo-/exonuclease Ddk1/c20orf72 necessary for maintenance of proper 7S DNA levels. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3144–3161.
- Tang S et al. 2011. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J. Med. Genet.* **48**, 669–681.
- * Tarnopolsky MA. 2011. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino Acids* **40**, 1397–1407.
- * Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402.
- Thomas D et al. 2008. Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol. cell* **100**, 591–601.
- Thorburn DR, Rahman S. 1993. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. in Pagon RA et al., (Ed.)
- Tiranti V et al. 1997. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 615–625.
- Tisdale HD. 1967. Preparation and properties of succinic—cytochrome c reductase (complex II–III). in *Methods in enzymology*. pp. 213–215.
- Torres-Torronteras J et al. 2014. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol. Ther.* **22**, 901–907.
- Torres-Torronteras J et al. 2016. Long-Term Restoration of Thymidine Phosphorylase Function and Nucleoside Homeostasis Using Hematopoietic Gene Therapy in a Murine Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum. Gene Ther.* **27**, 656–667.
- Tsukihara T et al. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136–1144.
- Tyynismaa H et al. 2005. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17687–17692.

- Vermulst M et al. 2008. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat. Genet.* **40**, 392–394.
- Wallace DC et al. 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427–1430.
- Walter MC et al. 2010. Late-onset ptosis and myopathy in a patient with a heterozygous insertion in POLG2. *J. Neurol.* **257**, 1517–1523.
- Wang L, Eriksson S. 2003. Mitochondrial deoxyguanosine kinase mutations and mitochondrial DNA depletion syndrome. *FEBS Lett.* **554**, 319–322.
- Wang X et al. 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **29**, 9090–9103.
- Wang X, Schwarz TL. 2009. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*.
- Wang Y, Shadel GS. 1999. Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8046–8051.
- Wanrooij S et al. 2008. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11122–11127.
- Wanrooij S et al. 2004. Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3053–3064.
- Watt IN et al. 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16823–16827.
- Williams SL et al. 2010. The mtDNA mutation spectrum of the progeroid Polg mutator mouse includes abundant control region multimers. *Cell Metab.* **12**, 675–682.
- Wintersberger E. 1964. DNA-DEPENDENT RNA SYNTHESIS IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **336**, 285–288.
- * Wirth C et al. 2016. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 902–914.
- Yang C et al. 1997. Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 153–157.
- Yang MY et al. 2002. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* **111**, 495–505.
- Yasukawa T et al. 2005. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol. Cell* **18**, 651–662.
- Yasukawa T et al. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J.* **25**, 5358–5371.
- * Ylikallio E, Suomalainen A. 2012. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.* **44**, 41–59.
- Young MJ et al. 2011. Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3052–3066.
- * Young MJ, Copeland WC. 2016. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* **38**, 52–62.
- Yu-wai-man P et al. 2010. OPA1 mutations cause cytochrome c oxidase deficiency due to loss of wild-type mtDNA molecules. **19**, 3043–3052.
- Yu-Wai-Man P et al. 2010. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* **133**, 771–786.
- Zeviani M et al. 1989. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* **339**, 309–311.
- Zeviani M et al. 1998. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. 1988. *Neurology* **51**, 1525 and 8 pages following.
- Zhang D-H et al. 2006. The human Pif1 helicase, a potential Escherichia coli RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1393–1404.
- Zheng L et al. 2008. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Mol. Cell* **32**, 325–336.
- Zheng W et al. 2006. Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase gamma-mediated errors. *Mutat. Res.* **599**, 11–20.
- Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J. 2016. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature* **536**, 354–358.

- Zickermann V et al. 2003. Functional implications from an unexpected position of the 49-kDa subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **278**, 29072–29078.
- Ziebarth TD, Farr CL, Kaguni LS. 2007. Modular architecture of the hexameric human mitochondrial DNA helicase. *J. Mol. Biol.* **367**, 1382–1391.
- Zuchner S et al. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 449–451.